

Université de la Réunion

UFR Sciences et Technologies

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de l'Université de la Réunion

Spécialité : Biologie Végétale

Présentée par :

Benjamin Fartek

Résistance de la canne à sucre à la maladie de la feuille jaune et à son vecteur *Melanaphis sacchari* :

Association marqueur-trait dans une population de cultivars, mécanismes de résistance au vecteur, et diversité génétique du vecteur.

Soutenue publiquement le 15 juin 2011

JURY :

Flavie VANLERBERGHE-MASUTTI – Directrice de recherche INRA

Rapporteur

Yvan RAHBE – Directeur de recherche INRA

Rapporteur

Pascale BESSE – Professeur à l'Université de la Réunion

Présidente du jury

Bernard REYNAUD – Chercheur CIRAD HDR

Directeur de thèse

Université de la Réunion

UFR Sciences et Technologies

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de l'Université de la Réunion

Spécialité : Biologie Végétale

Présentée par :

Benjamin Fartek

Résistance de la canne à sucre à la maladie de la feuille jaune et à son vecteur *Melanaphis sacchari* :

Association marqueur-trait dans une population de cultivars, mécanismes de résistance au vecteur, et diversité génétique du vecteur.

Soutenue publiquement le 15 juin 2011

JURY :

Flavie VANLERBERGHE-MASUTTI – Directrice de recherche INRA

Rapporteur

Yvan RAHBE – Directeur de recherche INRA

Rapporteur

Pascale BESSE – Professeur à l'Université de la Réunion

Présidente du jury

Bernard REYNAUD – Chercheur CIRAD HDR

Directeur de thèse



Ce travail a bénéficié du soutien financier du Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), de la Région Réunion, de l'Université de la Réunion, du Fonds Européen de Développement Régional (FEDER) et de l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR) – bourse 08-GENM-001.

*« La description exacte et précise
des phénomènes n'exige pas un
exposé aride et incolore »*

**- Alexander von Humboldt
(préface du Cosmos)**

Remerciements

Tout d'abord, un grand merci à Bernard Reynaud pour avoir dirigé cette thèse, malgré les écueils et les contretemps qui en ont émaillé le déroulement. Merci également pour m'avoir initié au monde merveilleux de l'EPG et introduit à Wageningen à la confrérie des électropénétrographes à l'occasion de son congrès d'août 2008, qui fut une expérience particulièrement enrichissante pour la suite de mes travaux.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'examiner cette thèse : Flavie Vanlerberghe-Masutti et Yvan Rahbé qui ont fait le déplacement jusqu'à la Réunion pour en être les rapporteurs, et Pascale Besse d'en être présidente ; je remercie également Benoît Moury, Angélique d'Hont et Philippe Rott pour les avis et conseils prodigués à l'occasion des comités de thèse.

Merci à Laurent et Samuel qui ont encadré cette thèse contre vents et marées pendant trois ans 'et quelque', et dont le soutien indéfectible a fini par permettre de la mener à bien.

Laurent, merci pour ton accueil et ces moments partagés dans le bureau, et pour avoir supporté mon sens particulier de l'humour pendant tout ce temps ; les débats ont parfois été houleux, mais nos discussions toujours enrichissantes, et auront au final beaucoup profité à l'accomplissement de la thèse.

Samuel, merci pour ta rigueur d'encadrement, notamment pour le traitement statistique des données, et m'avoir permis de profiter en avant première et à titre expérimental de la fameuse 'nibouchette®', la machine à réduire les publications et à sabrer les textes - et je sais que ça n'est pas une mince affaire de contenir mes envolées lyriques.

Un grand merci également à Hélène Delatte qui s'est investie dans l'étude de diversité et qui a pris de son temps ô combien précieux pour m'assister dans le traitement fastidieux des données de diversité et pour la rédaction des articles. Merci aussi et surtout pour ton dynamisme et ton enthousiasme communicatifs qui sont une vraie source de motivation.

Un grand merci à l'équipe « Canne à Sucre » dans son ensemble pour son assistance technique au laboratoire et au champ ; merci à Iréné Promi qui a supervisé avec son efficacité proverbiale la logistique des parcelles de canne ; à Richard Tibère à qui les travaux de diversité doivent beaucoup, pour l'ampleur de la collecte réunionnaise ; à Hugues Telismart, Magali Payet et Cédric Lallemant pour leur bonne humeur et leur appui sans faille. Merci à Martial Grondin et Patrick Turpin pour leur aide technique indispensable lors des manip d'EPG, et à Karine Vital pour m'avoir prêté son séquenceur le temps de passer quelques plaques. Merci également aux VCAT et stagiaires qui ont participé à ces travaux : Cédric Calmes qui n'a pas refait surface, Audrey Anglade et ses légumes pour leur soutien sans failles à l'élaboration du 'fartequetal', Stelly Mississippi pour l'acquisition des données de diversité, et Stéphane François dont j'espère que le bref séjour aura donné envie de poursuivre dans cette voie.

Un merci particulier à toutes les personnes rencontrées à la Réunion pour les moments partagés, au labo comme en dehors, et qui m'ont soutenu dans les moments de creux. Merci particulièrement à Gilles Cellier (et sa maman), Simon 'Saumon', le gang des motards, la menuiserie et toute la clique, Che Julien 'julianito' & Jaëla, Max & Julie, Aline & Mayeul, Rémy & Laura, Alex & Camille 'Poux', Jean-Charles & Véronique, Matthieu 'Gouy-gouy' & Gaëlle, Matthieu (bis), Nath, Steph, et plus généralement tous les Ciradiens et non-Ciradiens dont j'ai pu croiser la route au laboratoire comme à la ville pendant ces années Réunionnaises.

Merci à mes partenaires minceur qui ont aidé à façonner ma silhouette d'athlète et noyer les moments difficiles dans une choppe de bière : les caris de la Ligne Paradis, la Masca, le Delirium Tremens (RIP), le Toit, l'Auberge Espagnole et les 3 Brasseurs.

Un merci particulier à l'ensemble de mes chauffeurs personnels qui m'ont transporté d'un bout à l'autre de l'île, et ont ainsi contribué à rendre le calvaire de la vie réunionnaise piétonne un peu plus supportable.

Je tiens à saluer mon frangin Alexis, qui a pris la sage décision d'abandonner la biologie tant qu'il était encore temps ; je lève également ma choppe à toutes les personnes en métropole qui ont suivi mes péripéties de près ou de loin et qui ont cruellement manqué à l'appel ces dernières années : Chris, Thib, GoF, Elo, Véro, Danette, Joe, Jean-phi, Val & le JAF, également à Camille, Deedee, sans oublier Renaud, Noémie, Rémi, Bastouch et le reste de la 'BDC', les Cergysois : Quentin, Stephen, Auré, Lorraine, les Orcéens, ainsi que tous ceux que j'ai pu oublier, la liste est loin d'être exhaustive... you know who you are. Cheers !

Un grand merci à ma famille pour son soutien indéfectible, en particulier mes grands parents dont l'absence m'a beaucoup pesé pendant ces années aux antipodes, et mes parents qui ont été parfaits de bout en bout, depuis ma première encyclopédie des animaux jusqu'aux derniers instants de cette thèse. Merci à vous tous.

Enfin, merci à Solenn pour ces années de vie commune, merci, simplement, d'avoir toujours été là.

Table des matières

Avant-propos	1
Introduction	2
I La canne à sucre	2
1. Présentation / botanique	3
2. Histoire de la canne à sucre	4
2.1 Historique de la diffusion	4
2.2 Historique de la sélection	5
3. Génétique de la canne à sucre	6
II La maladie de la feuille jaune	8
1. Généralités	8
2. Agent causal : le <i>Sugarcane yellow leaf virus</i> (SCYLV)	8
2.1 Historique	8
2.2 Caractéristiques moléculaires du virus	9
2.3 Diversité virale	10
2.4 Mode de transmission	11
2.5 Espèces vectrices	12
2.6 Gamme d'hôte	13
3. <i>Melanaphis sacchari</i> : biologie et taxonomie	13
3.1 Présentation	13
3.2 Taxonomie	14
4. Importance économique de la maladie	15
5. Résistance variétale à la maladie de la feuille jaune	15
III Résistance des plantes aux pucerons	17
1. Généralités sur les résistances	17
2. Interactions plante – puceron et mécanismes de résistance	18
2.1 Phase d'approche : signaux d'atterrissage	18
2.2 Premier contact : défenses du phylloplane	19
2.3 Première piqûre : goûtez avant d'entrer	20
2.4 Déterminants du mésophylle : progression à couvert	21
2.5 Première piqûre dans le phloème : « target acquired »	22

2.6	Ingestion dans le phloème : tromper l'ennemi, et saboter les défenses	23
3.	Bases moléculaires de la résistance aux pucerons	24
4.	Bases génétiques de la résistance aux pucerons	25
4.1	Gènes de résistance décrits.....	25
4.2	Expression de la résistance.....	26
4.3	Résistances polygéniques.....	26
4.4	Structure des loci de résistance	27
IV	Spécificité des résistances et diversité génétique des pucerons	28
1.	Diversification des pucerons : radiation et spéciation écologique.....	28
2.	Cycles biologiques	29
2.1	Cycle avec alternance d'hôte : 'dioécie'	29
2.2	Cycle à un seul hôte : 'monoécie'	29
2.3	Absence de reproduction sexuée : anholocyclie.	30
3.	Anholocyclie et holocyclie : succès démographique vs succès évolutif.....	30
4.	Superclones : chronique d'un succès démographique	31
5.	Biotypes et races d'hôte : menace latente	32
V	Association Mapping chez la canne à sucre	34
1.	Avantages et limites de l'Association Mapping	35
2.	Faisabilité de l'Association Mapping chez la canne à sucre.....	35
3.	Marqueurs moléculaires et couverture du génome de la canne à sucre.....	36
VI	Objectifs de la thèse.....	38
Chapitre 1 : Génétique d'association pour la résistance à la maladie de la feuille jaune.....		39
Chapitre 2 : Mécanismes de résistance à <i>Melanaphis sacchari</i> chez le cultivar R 365		64
Chapitre 3 : Taxonomie, diversité et structuration des populations de <i>Melanaphis sacchari</i> .		90
I	Développement d'une banque de loci microsatellite spécifique à <i>Melanaphis sacchari</i>	93
II	Taxonomie et diversité mondiale du complexe d'espèces <i>Melanaphis</i> spp de la canne à sucre et espèces apparentées.....	101
III	Diversité génétique et races d'hôte de <i>Melanaphis sacchari</i> à la Réunion	124
Discussion		126
I	Génétique d'association pour la résistance à la maladie de la feuille jaune.....	126
1.	Résultats.....	126
2.	Perspectives.....	127

2.1	Cartographie d'un locus de résistance.....	127
2.2	Validation et approches prédictives en sélection	128
2.3	Lien entre résistance au vecteur et incidence de la maladie.....	129
2.4	Remarques pour conclure.....	130
II	Etude de la résistance à <i>Melanaphis sacchari</i> chez le cultivar R 365	131
1.	Rappel des résultats.....	131
2.	Perspectives.....	131
2.1	Bases génétiques de la résistance R 365	132
2.2	Caractérisation fine de la résistance	133
III	Taxonomie, diversité et structuration des populations de <i>Melanaphis sacchari</i>	136
1.	Résultats obtenus	136
2.	Perspectives.....	136
2.1	Taxonomie : le complexe <i>Melanaphis</i> spp.....	136
2.2	Schémas et voies d'invasion	137
2.3	Interactions entre diversité du puceron et variabilité des plantes hôtes	138
2.4	Remarques pour conclure : quel statut taxonomique donner aux groupes <i>Melanaphis sacchari/sorgho/spp</i> ?.....	142
	Bibliographie	144

Avant-propos

« Le café doit être noir comme la nuit, chaud comme l'enfer et doux comme l'amour ». Cette phrase, attribuée à Voltaire, alors hôte de Frédéric II, illustre l'essor des produits issus du commerce exotique entre le XV^{ème} et le XVII^{ème} siècle, sous l'impulsion d'une demande sans cesse renouvelée de nouveautés culinaires. Le café et le sucre, l'un revêche et l'autre doux, furent les étendards de cette mondialisation avant l'heure. Ces saveurs alors inconnues, qui se prêtaient au raffinement de la cour de Prusse, furent les symboles d'un faste issu de la Renaissance ; aujourd'hui, elles habitent notre quotidien sans que l'on y prête plus guère attention.

A la Réunion notamment, les deux cultures se sont succédé dans l'histoire de l'île, lui apportant d'une part un essor économique fulgurant, mais aussi et surtout sa diversité culturelle unique, au prix du drame humain de la traite négrière dans l'Océan Indien. La culture de la canne à sucre y a supplanté celle du café au début du XIX^{ème} siècle, et n'a cessé de croître depuis lors, structurant la vie économique et sociale de l'île, à peine égratignée par l'émergence de la betterave au XX^{ème} siècle. Si à ses débuts, elle ne servait qu'à fabriquer un alcool local, l'arack, et à fournir du fourrage pour le bétail, elle est rapidement adoptée comme culture dominante : ainsi, aux alentours de 1850, le nombre de sucreries passe d'une petite dizaine à près de 200 en moins de quinze ans, ce qui donne une idée de l'explosion de son exploitation. Ce succès ne s'est jamais démenti, et reste toujours d'actualité à une époque où les variétés produites par le centre de sélection local, eRcane, comptent parmi les plus performantes.

Aujourd'hui, près de 300 ans après son introduction sur l'île, la canne à sucre réunionnaise doit faire face à de nouveaux défis : diminution des surfaces cultivées face à l'urbanisation croissante, lutte contre de nouveaux ravageurs, ou encore développement de canne riche en fibre pour la production de bioéthanol, toujours en s'inscrivant dans une approche nécessaire de 'développement durable'. Afin de répondre au mieux à ces défis, et d'envisager sereinement un nouveau siècle de culture, elle devra résolument s'appuyer sur l'utilisation de nouvelles technologies : utilisation de marqueurs moléculaires en sélection, approche pangénomique, autant d'innovations rendues possibles par de nouvelles technologies de génotypage à haut débit, qui lui permettront de consolider durablement son assise et moderniser ses schémas d'amélioration variétale.



INTRODUCTION

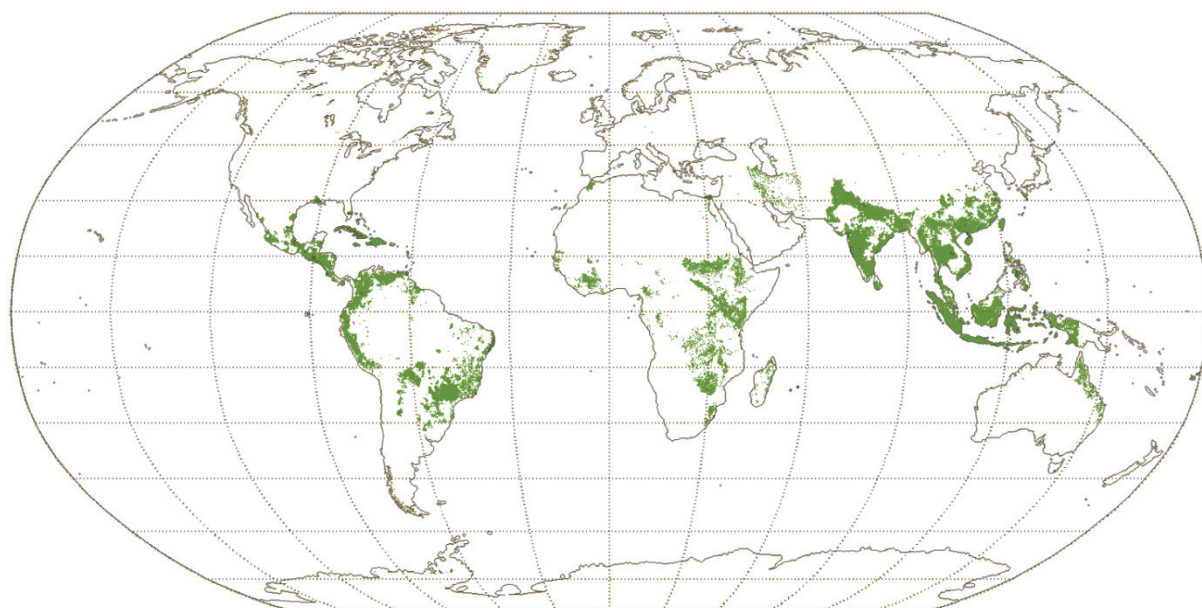


Figure I.1 : Répartition mondiale des principales zones de production de canne à sucre (d'après Monfreda et al. 2008).

Rang	Pays	Surface cultivée (Ha)	Production (Tonnes de canne)	Rendement (Tonnes de canne/Ha)
1	Brésil	8 598 440	689 895 024	80
2	Inde	4 400 000	285 029 000	65
3	Chine	1 630 520	113 745 502	70
4	Thaïlande	932 465	66 816 446	72
5	Pakistan	1 029 000	50 045 000	49
6	Colombie	379 505	38 500 000	101
7	Australie	391 291	31 456 858	80
8	Argentine	355 000	29 950 000	84
9	Etats-Unis	353 659	27 455 950	78
10	Indonésie	420 000	26 500 000	63
11	Philippines	404 000	22 932 819	57
16	Equateur	106 825	8 473 141	79
21	Kenya	65 774	5 610 702	85
23	Maurice	60 503	4 669 420	77
29	Cameroun	145 000	1 450 000	10
-	La Réunion	24 528	1 800 000	73
-	Guadeloupe	10 500	700 000	67
Total Monde		23 727 751	1 682 577 768	

Tableau I.2 : Classement des principaux pays producteurs de canne à sucre, et données de production associées (FAO 2009).

Introduction

I La canne à sucre

Culture tropicale par excellence, la canne à sucre a marqué l'histoire des hommes au cours de son expansion, autour de son industrie et de son commerce, autant qu'elle a façonné les paysages de nombreuses régions productrices (**figure I.1**). La canne à sucre est la première plante sucrière au monde, loin devant la betterave, avec environ 75% de la production totale de sucre (155 millions de tonnes en 2009), ce qui représente actuellement environ 1,7 milliards de tonnes de canne à sucre produites chaque année sur 24 millions d'hectares (FAO 2009) (**Tableau I.2**). Plus de la moitié de la production de canne à sucre est réalisée au Brésil (690 Mt) et en Inde (285Mt). La production réunionnaise est de 1,8Mt de canne pour une production d'environ 200 000 t de sucre, soit 10% de la consommation française. Le sucre est utilisé pour un usage alimentaire, mais une grande partie est aujourd'hui transformée en éthanol, notamment au Brésil où la moitié de la production de sucre est utilisée pour produire du bioéthanol, principalement destiné à la consommation automobile (Waclawovsky *et al.* 2010).

Le sucre n'est pas le seul produit de la canne à sucre : on sait aujourd'hui valoriser son incroyable production de biomasse en exploitant au mieux les résidus de l'extraction du saccharose, les 'sous-produits' de la canne :

- On utilise notamment la mélasse, résidu sucré mais non cristallisable, soit pour en faire de l'alcool (rhum industriel) après distillation, soit encore comme complément alimentaire destiné au bétail. La distillation produit également des sous-produits, notamment les vinasses, riches en potassium, qui peuvent être utilisées comme complément de fertilisation.
- Les résidus fibreux, ou bagasse, sont utilisés comme combustibles dans des centrales thermiques. La bagasse a permis la production d'environ 10% de l'électricité de l'île de la Réunion en 2010. La bagasse est également utilisée comme complément alimentaire pour les animaux, pour la fabrication de papier, de matériaux de construction et d'ameublement. Sa transformation en bioéthanol, dit de 'seconde génération', est actuellement un sujet d'intérêt de premier plan, et la sélection de cultivars riches en fibres et destinés à la production de biomasse est actuellement à l'étude.

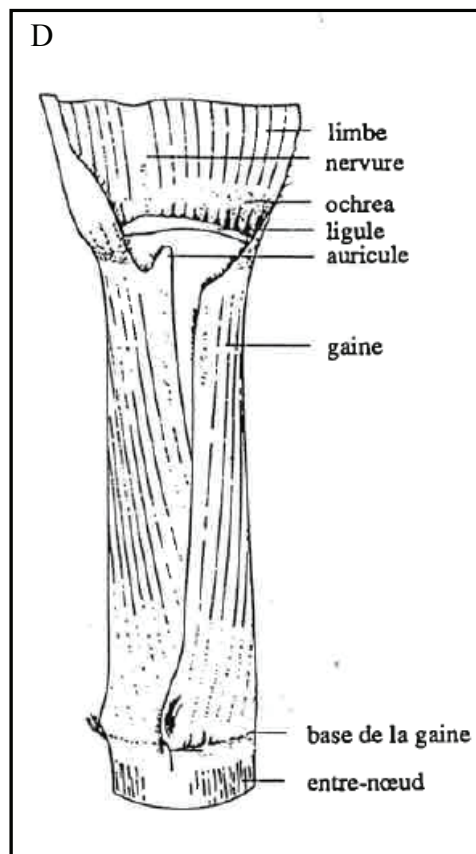
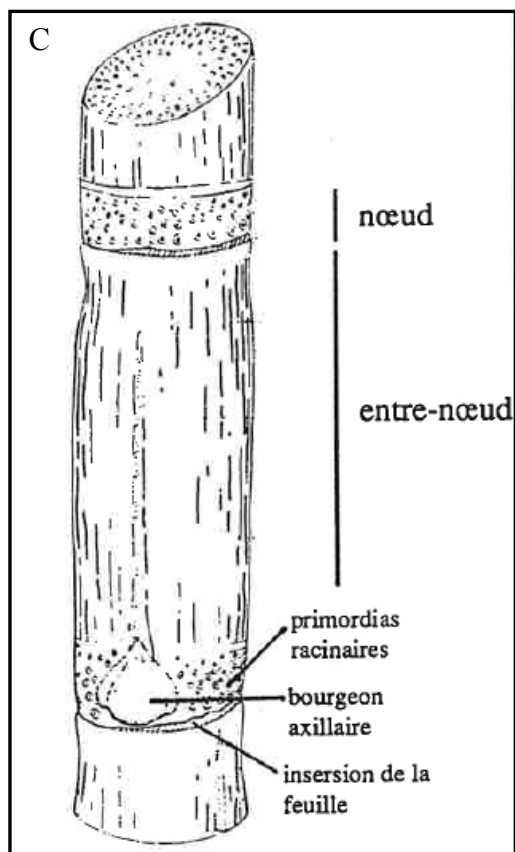
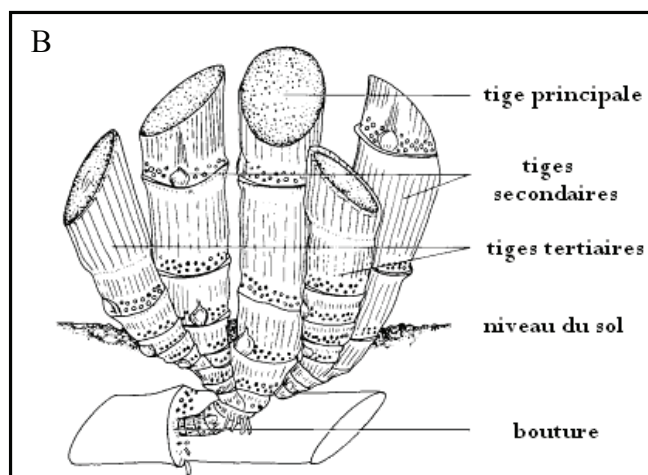


Figure I.3 : Morphologie de la canne à sucre : A : vue d'ensemble d'un plant de canne à sucre issu d'une bouture ; B : détails du plateau de tallage issu de la bouture ; C : structure d'une tige de canne à sucre ; D : structure d'une feuille de canne à sucre au niveau de l'insertion sur l'entre-nœud (Artschwager and Brandes 1958; repris de Grivet 1995).

- Les résidus de filtrations, ou écume, produits lors de l'extraction du jus de canne, sont riches en phosphore et en calcium et peuvent être utilisés comme engrais.

La canne à sucre est une des plantes les plus productrices de biomasse et possède un des meilleurs rendements énergétiques (Whitmarsh et Govindjee 1999) : ainsi, une unité énergétique consommée pour la production permet la génération de huit unités énergétiques (De Vries *et al.* 2010). Cette qualité en fait une des principales plantes candidates pour la production d'éthanol de seconde génération, plus rentable et moins polluant. La plante entière serait utilisée pour subir une fermentation enzymatique de la cellulose. De nombreux centres de sélection ont déjà orienté une partie de leur programme afin d'optimiser la quantité et la qualité de biomasse lignocellulosique (Loureiro *et al.* 2011 ; Soccol *et al.* 2011).

Cette diversité des applications fait de la canne à sucre une culture majeure dans de nombreuses régions chaudes (**figure I.1**).

1. Présentation / botanique

La canne à sucre est une plante de la famille des Poacées, dont la principale caractéristique est l'accumulation de saccharose dans ses tiges. Le nom commun 'canne à sucre' regroupe les espèces du genre *Saccharum* : (i) les espèces sauvages *S. spontaneum* (L.), pauvre en sucre et *S. robustum* (Brandes & Jeswit ex Grassl), (ii) les espèces domestiquées sucrières *S. officinarum* (L.), *S. barberi* (Jeswiet) et *S. sinense* (Roxburgh), et (iii) *S. edule* (Hasskarl) dont les inflorescences sont comestibles. Les variétés commerciales, cultivées pour leur sucre, sont issues de croisements interspécifiques entre l'espèce noble *Saccharum officinarum* riche en sucre, et les espèces sauvages ou domestiquées du genre *Saccharum* (Grivet *et al.* 2006).

Les variétés cultivées de canne à sucre et les espèces dont elles sont issues présentent une physionomie très proche, avec quelques particularités propres (**figure I.3**). Ce sont des graminées pérennes, hautes de 3 à 5 mètres, qui se développent en touffes de tiges. Chaque tige comprend une succession d'entre-nœuds et de nœuds, où s'insèrent des feuilles alternes, composées d'une gaine qui enveloppe la tige, et d'un limbe foliaire marqué d'une épaisse nervure centrale. L'inflorescence est une panicule ramifiée à épillets bisexués qui se développe à l'extrémité des tiges. La floraison, considérée comme contre-productive pour le rendement en sucre, est un caractère contre-sélectionné chez les variétés cultivées. Les graines ne sont utilisées qu'à des fins de sélection, mais jamais en tant que semence pour la culture. Les variétés cultivées sont des clones issus de multiplication végétative par boutures. Chaque cycle de culture, d'une durée de 10 à 24 mois en fonction des conditions agroclimatiques, est

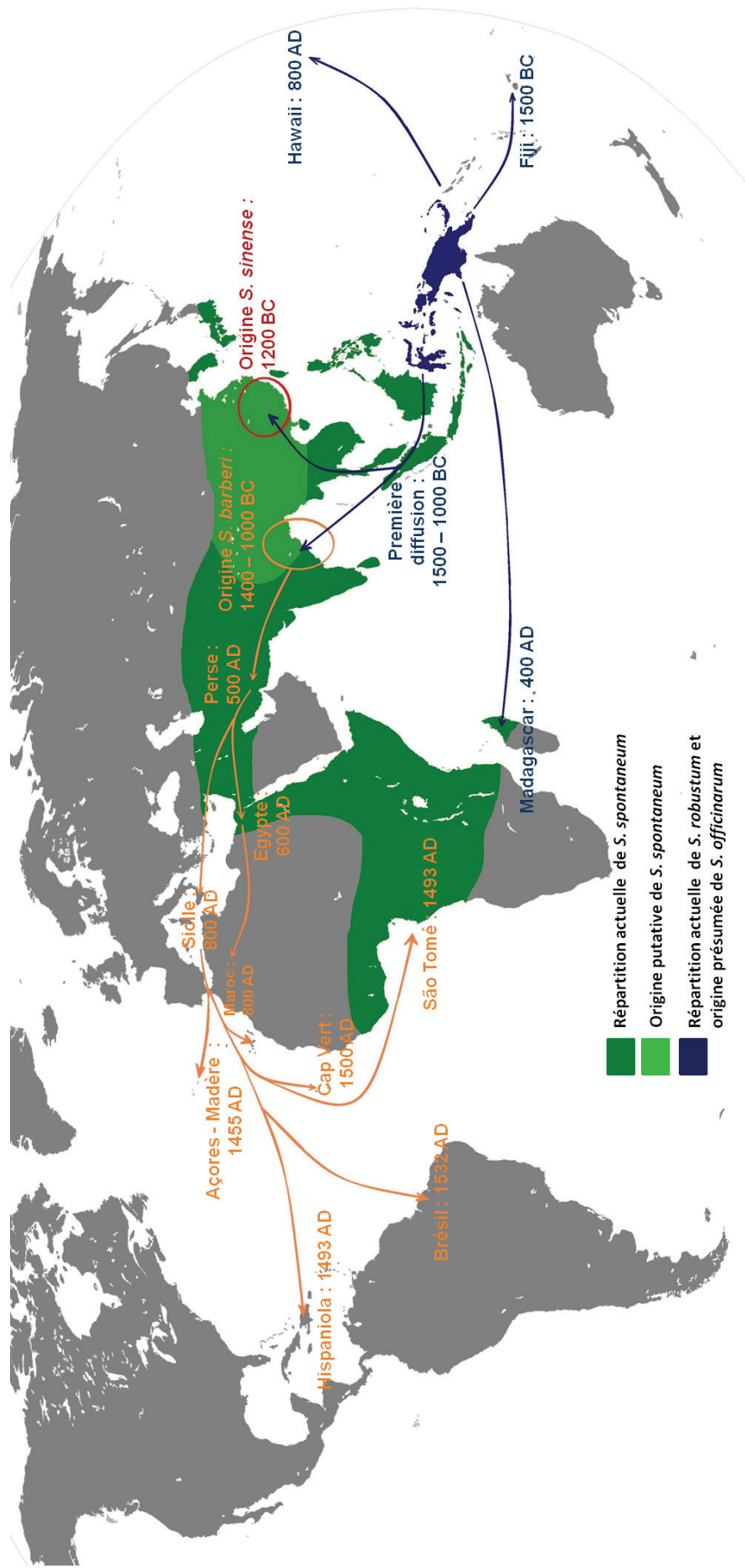


Figure I.4 : Historique de la diffusion de la canne à sucre (d'après Stevenson 1965 ; Meyer 1989 ; Grivet 1995).

composé d'un cycle de repousse complet jusqu'à la coupe. La culture est pérenne, c'est-à-dire qu'elle reste en place pendant plusieurs années sans replantation. Les rendements sont généralement maximaux lors du premier cycle de culture (canne vierge), puis décroissent à chaque repousse suivante. Dans la majorité des régions tropicales, les plantations sont reconduites pour 5 à 7 cycles de culture, alors que dans certaines régions où la récolte mécanique abîme le plateau de tallage, notamment à Hawaï, un seul cycle de repousse est effectué (Plucknett *et al.* 1970).

2. Histoire de la canne à sucre

2.1 Historique de la diffusion

L'histoire de la culture de la canne à sucre commence à la sortie de la préhistoire, aux alentours de -2500 ans, dans la région de l'actuelle Papouasie-Nouvelle Guinée (**figure I.4**). C'est là que la domestication de cette plante aurait débuté ; la culture de la canne à l'époque n'était probablement pas destinée à en extraire le sucre, mais plutôt à en mâcher les tiges pour en déguster le jus. Cette origine mélanésienne, autrefois contestée, est confirmée par la plus grande diversité morphologique des clones de *Saccharum officinarum* dans cette zone (Daniels et Roach 1987), ainsi que par la présence dans la région de l'espèce sœur *S. robustum* à partir de laquelle *Saccharum officinarum* aurait été domestiquée (Lu *et al.* 1994).

La canne à sucre aurait été apportée en Asie continentale au cours du deuxième millénaire avant notre ère, où l'hybridation avec l'espèce indigène proche *S. spontaneum* serait à l'origine des espèces hybrides *S. barberi* et *S. sinense* (D'Hont *et al.* 2002). Ces espèces sont considérées comme les premières à avoir été cultivées pour leur sucre, et se sont largement diffusées en Inde et en Chine durant cette période. Le procédé de cristallisation a été découvert en Inde aux alentours de 350, et rapidement transféré en Chine sous l'impulsion de moines bouddhistes. Ce procédé, permettant le transport et le conditionnement durable du sucre, en accéléra le commerce vers l'ouest, et encouragea la diffusion de la culture. Celle-ci a été introduite par les marchands indiens, d'abord en Perse et Mésopotamie vers 500, puis progressivement autour du bassin méditerranéen au Moyen Âge (Meyer 1989).

C'est à la même période que les migrations austronésiennes auraient permis la diffusion de la canne à sucre vers les îles du Pacifique Sud et Hawaï. Contrairement au versant européen, marqué par l'influence indienne et les clones de *S. barberi*, ce sont vraisemblablement des clones de *S. officinarum* qui ont été introduits dans le Pacifique ; cette espèce ne sera redécouverte par les Européens qu'au XVIII^{ème} siècle.



Figure I.5 : Premiers essais de création variétale, “Proefstation Oost-Java”, début XX^{ème} siècle (source : Tropenmuseum, NL ; photographies sous licence libre wikimedia commons).

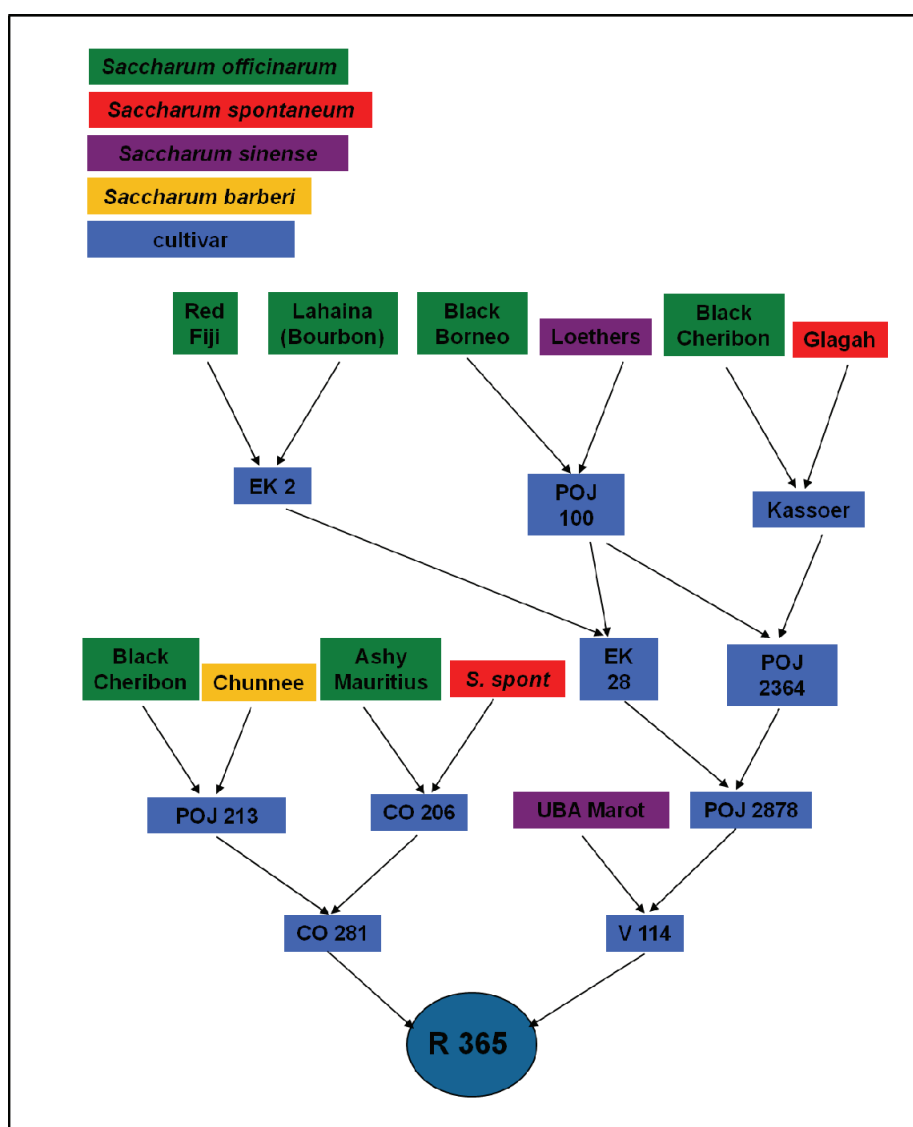


Figure I.6 : Généalogie du cultivar R 365 (d'après McMartin 1940; Ruiz et al. 2004)

La demande croissante en sucre des Européens accéléra la diffusion de la canne à sucre, d'abord au XV^{ème} siècle dans les îles de l'Atlantique (Canaries, Madère, Açores, Cap Vert et São Tomé), où sa culture est à l'origine de la première traite négrière à grande échelle. Christophe Colomb l'importa aux Amériques, et la culture prit entre le XVII et XVIII^{ème} siècle l'ampleur qu'on lui connaît dans les Caraïbes et au Brésil, sous l'influence successive des Portugais, Hollandais puis Français et Anglais (Meyer 1989). C'est à cette période que les premiers clones de *Saccharum officinarum*, plus riches en sucre, sont apportés du Pacifique par les navigateurs et commencent à remplacer les clones de *S. barberi* habituellement cultivés (Stevenson 1965).

2.2 Historique de la sélection

La production de cultivars hybrides commence à la fin du XIX^{ème} siècle, à Java puis en Inde, à Coimbatore. L'ouverture des centres de sélection fait face à la demande pressante de clones résistants aux maladies, notamment afin de faire face à des épidémies de mosaïque (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV, genre *Potyvirus*) qui ravageaient alors les cultures de Java, sans que des sources de résistance puissent être trouvées au sein de l'espèce *S. officinarum* (Rands et Abbott 1964) (**Figure I.5**).

Les premiers processus de sélection sont basés sur des croisements entre des clones dits 'nobles' de *S. officinarum*, et des clones d'espèces plus rustiques, notamment *S. spontaneum* (**Figure I.6**). Ce procédé, appelé 'nobilisation', est suivi de plusieurs backcross successifs avec des clones de *S. officinarum* pour retrouver le caractère de richesse en sucre, sans que le parent 'noble' soit nécessairement le même à chaque nouveau croisement (**Figure I.7**). Ces nouveaux hybrides constituent les premiers « cultivars modernes » au sens propre, et sont toujours utilisés à l'heure actuelle dans les schémas de sélection. D'autre part, ces croisements n'ont impliqué qu'un nombre restreint de clones sauvages, notamment pour *S. spontaneum*, ce qui suggère que seule une faible partie de la diversité génétique du genre *Saccharum* a été utilisée en sélection. Les schémas de sélection plus récents se sont donc attachés à entreprendre de nouveaux travaux de nobilisation, afin d'introduire de la diversité supplémentaire dans le germplasm cultivé. Le processus de création variétale repose sur l'utilisation de géniteurs récurrents et répond à des critères précis issus de demandes des planteurs et des usiniers afin d'améliorer la qualité agronomique et sanitaire des cultures, ainsi que les caractéristiques technologiques de la canne récoltée. Les programmes de sélection sont basés sur l'échange de matériel végétal entre centres de sélection, et le maintien de collections de ressources génétiques afin de diversifier au maximum les sources de caractères

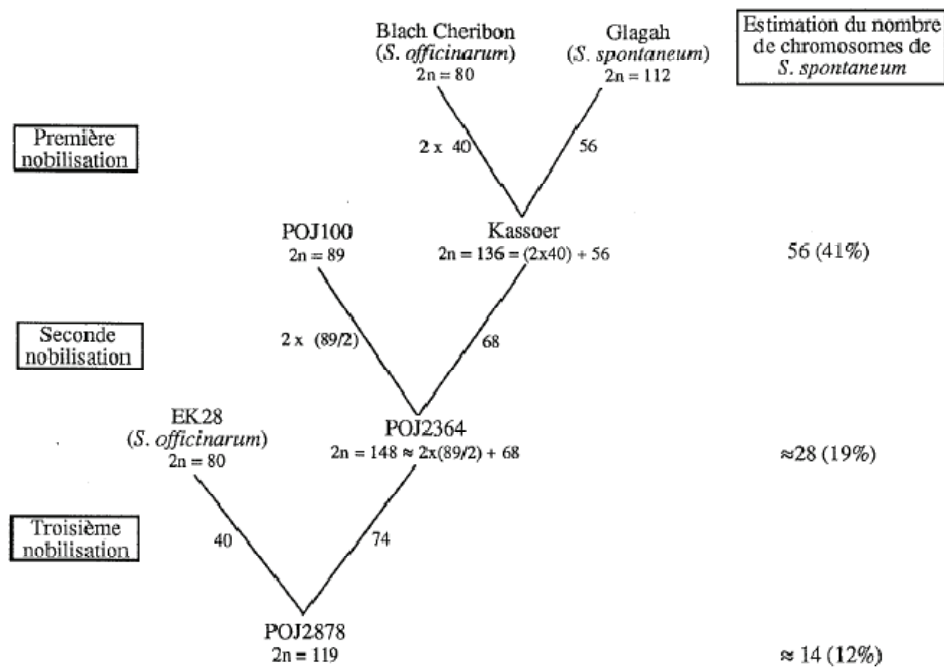


Figure I.7 : Transmission des chromosomes au cours des travaux de nobilisation menés à la station expérimentale de Java, ayant abouti au cultivar POJ 2878. Les nombres sous les barres représentent le nombre de chromosomes transmis à la descendance (d'après Bremer 1961; Grivet 1995).

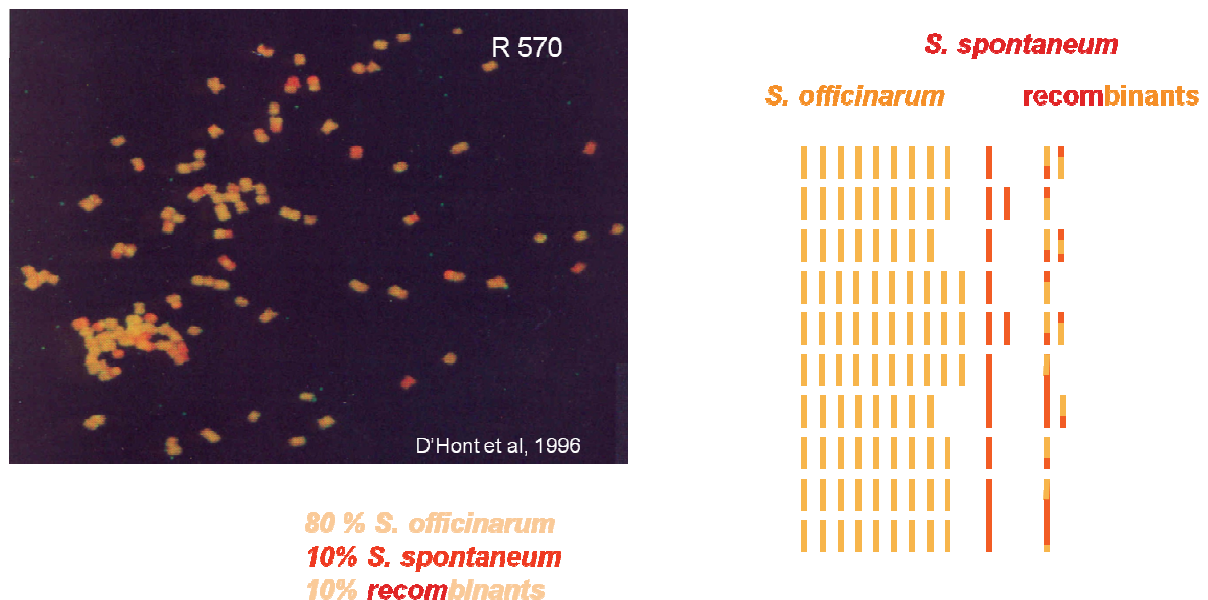


Figure I.8 : Structure du génome d'un cultivar moderne de canne à sucre : R 570.

Gauche : hybridation in-situ des chromosomes ; jaune : chromosomes ou fragments hérités de *S. officinarum* ; rouge : chromosomes ou fragments hérités de *S. spontaneum* (D'Hont et al. 1996) ; droite : structure schématique du génome : chaque ligne correspond à un groupe d'homologie (Raboin 2005).

d'intérêt. Une trentaine de centres de sélection fonctionnent à travers le monde et produisent de nouvelles variétés, afin d'améliorer le rendement, mais aussi de répondre à de nouveaux objectifs de sélection, notamment la production de canne fibreuse pour la production de bioéthanol cellulosique, ou la sélection pour la résistance à des bioagresseurs émergents ou nouvellement décrits.

3. Génétique de la canne à sucre

Les espèces du genre *Saccharum* ont un génome complexe : en effet, à l'instar de nombreuses graminées, elles sont polyploïdes. Les espèces *S. spontaneum*, *S. officinarum*, *S. robustum* sont des autopolyploïdes¹, dont les chromosomes s'apparient majoritairement sous forme de bivalents lors de la méiose. Chaque espèce présente un nombre variable de chromosomes. *S. officinarum*, avec $2n=80$, est octoploïde et euploïde avec un nombre de chromosomes de base $x=10$ (D'Hont *et al.* 1998). L'ancêtre supposé de *S. officinarum*, *S. robustum*, présente des formes euploïdes² qui possèdent 60 ou 80 chromosomes avec un nombre de base de $x=10$ pour un niveau de ploïdie de 6 ou 8, alors que des clones aneuploïdes $2n=63$ à 205 existent et pourraient correspondre à des hybrides avec d'autres espèces (Price 1957 ; Price 1965). La plus grande irrégularité est observée chez *S. spontaneum*, où $2n$ varie entre 40 et 128 (Naidu et Sreenivasan 1987) avec un nombre de chromosomes de base $x=8$ et des niveaux de ploïdie variant entre 8 et 12 (D'Hont *et al.* 1998). Les espèces *S. barberi* et *S. sinense*, probablement issues d'hybridations naturelles entre *S. officinarum* et *S. spontaneum*, présentent un nombre de chromosomes variant entre 82 et 124 (Price 1968). De part leurs origines interspécifiques, les cultivars modernes de canne à sucre présentent donc un génome extrêmement complexe. Ils sont allo polyploïdes et aneuploïdes. Ils comptent un nombre de chromosomes variant de $2n=100$ à 130, chaque chromosome de base étant représenté potentiellement entre 10 et 12 fois (Naidu et Sreenivasan 1987). Lors des premières étapes de la nobilisation, les clones de *S. officinarum* transmettent $2n=80$ chromosomes au lieu des $n=40$ attendus. Ce n'est que lors du troisième backcross que *S. officinarum* transmet n chromosomes (Bremer 1961) (**Figure I.7**). Ce phénomène est encore mal connu mais deux hypothèses sont aujourd'hui retenues : i/ doublement chromosomique par endoduplication ou ii/ fusion de deux noyaux après la seconde division de méiose. La nobilisation a donc eu pour conséquence de réduire le nombre relatif de chromosomes de *S. spontaneum* à l'issue de la méiose (Sreenivasan *et al.* 1987). A

¹ Autopolyploïde : organisme polyploïde dont le génome est constitué de plusieurs copies d'un génome de base

² Euploïde : organisme polyploïde dont le nombre total de chromosomes est un multiple de son nombre chromosomique de base. Les organismes au nombre de chromosomes irrégulier sont dits 'aneuploïdes'.

GRASS GENOMES

Oats
Triticeae
Maize
Sorghum
Sugar cane
Foxtail millet
Rice

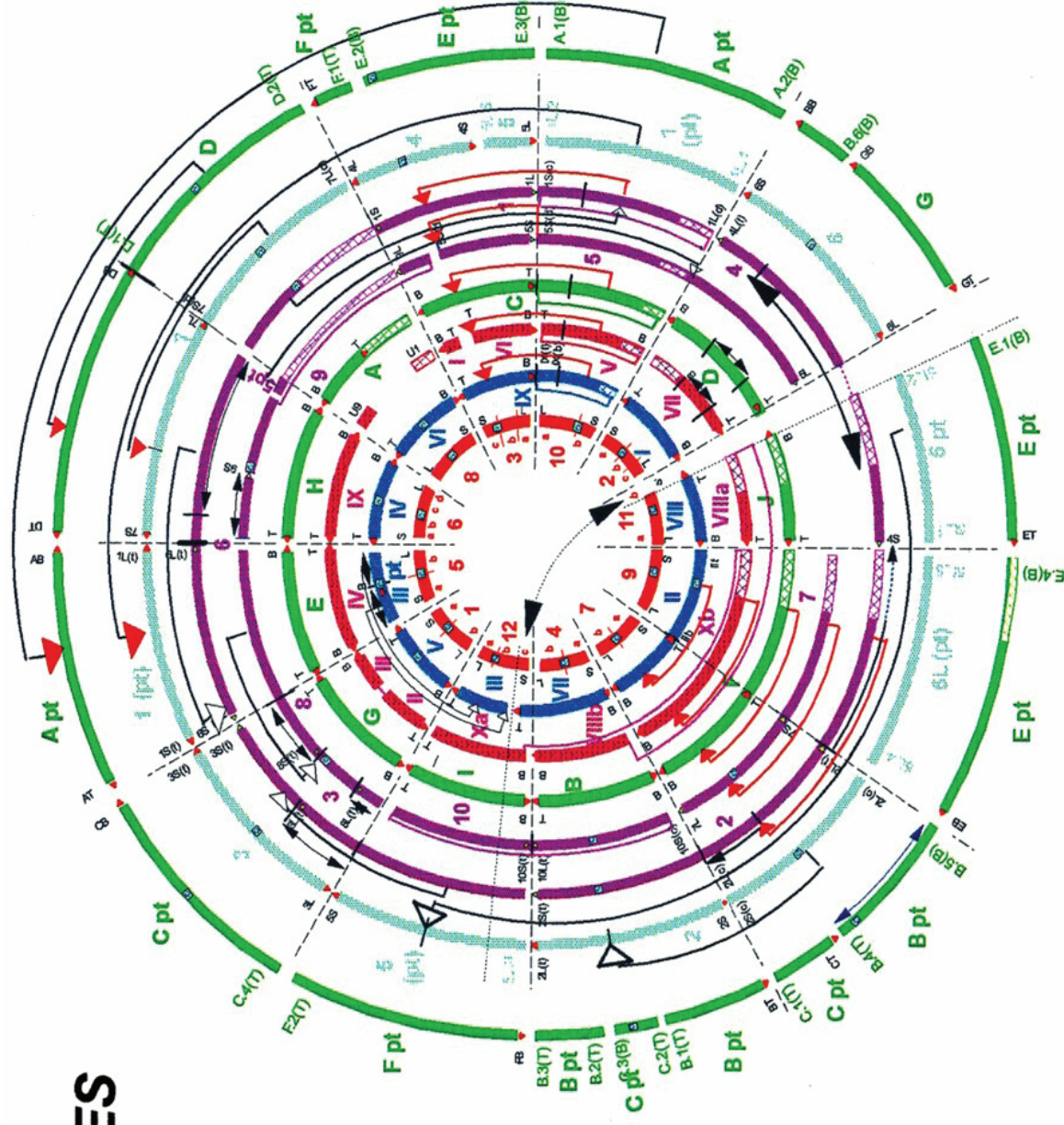


Figure 1.9: Carte consensus comparative illustrant les relations synténiques entre différents génomes de poacées (Gale and Devos 1998). Chaque cercle concentrique représente un génome de base, le plus externe étant l'avoine (oat), et le plus interne le riz (rice) ; chaque groupe d'homologie est représenté par un seul chromosome. Les lettres et chiffres romains indiquent les groupes de coségrégation dans la carte d'origine. Les flèches indiquent des événements putatifs d'inversion ou de transposition de chromosomes. Δ : localisation des télomères \square : localisation des centromères hachures : régions 'incertaines'.

l'issue du processus de nobilisation, on estime que les cultivars modernes contiennent une majorité de chromosomes issus de *S. officinarum*, entre 10 et 27% de chromosomes de *S. spontaneum* et entre 8 et 13% de chromosomes recombinants (D'Hont *et al.* 1996 ; Piperidis *et al.* 2010) (**Figure I.8**).

Au cours de la méiose, l'appariement entre chromosomes se fait généralement par formation de bivalents, avec des associations préférentielles entre membres d'un même groupe d'homologie, bien que quelques irrégularités existent (Burner et Legendre 1993). Le cultivar réunionnais R 570 a été l'objet de nombreuses études qui ont permis d'estimer la taille de son génome à 10 000 Mb au niveau physique et 17 000 cM au niveau génétique (Hoarau *et al.* 2001). La taille estimée du génome haploïde est de 960 et 750 Mb respectivement chez *S. officinarum* et *S. spontaneum*, ce qui correspond approximativement à la taille du génome du sorgho, et deux fois celle du riz (D'Hont et Glaszmann 2001).

Malgré la complexité du génome des espèces du genre *Saccharum*, des cartes génétiques ont été réalisées : plusieurs cartes sont disponibles pour chacune des espèces *S. officinarum* (Ming *et al.* 1998 ; Guimarães *et al.* 1999) et *S. spontaneum* (Al-Janabi *et al.* 1993 ; da Silva *et al.* 1995) et une carte pour *S. robustum* (Guimarães *et al.* 1999). Pour les cultivars modernes, plusieurs cartes ont été réalisées et sont la base de travaux de recherche de QTLs. Les cartes les plus complètes concernent R 570 (Hoarau *et al.* 2001 ; Rossi *et al.* 2003 ; Raboin *et al.* 2006), Q165 (Aitken *et al.* 2005), et LCP 85-384 (Andru *et al.* 2011) ; aucune de ces cartes n'est saturée et la longueur cumulée des cartes de Q 165 et R 570, les plus denses à l'heure actuelle, sont respectivement de 9058 et 7675 cM. La majorité des cartes ont été réalisées à partir de marqueurs RFLP, et plus récemment de SSR, qui sont locus-spécifiques et permettent de réunir les groupes de coségrégation (chromosomes ou fragments de chromosomes) en groupe de liaisons (groupe d'homologie). Les marqueurs AFLP sont également très utilisés pour augmenter la saturation des cartes, cette technique permettant de générer un grand nombre de marqueurs (Grivet et Arruda 2002).

Ces cartes ont également permis de révéler les forts degrés de relations synténiques (Gale et Devos 1998) qui existent entre le génome de la canne à sucre et ceux du maïs et du sorgho (Asnaghi *et al.* 2000), mais également avec celui du riz malgré une plus forte distance génétique avec la canne (Glaszmann *et al.* 1997). Cette forte conservation de l'organisation des chromosomes (**figure I.9**) permet de transférer les données acquises d'une espèce à une autre pour l'identification de zones d'intérêt (Ilic *et al.* 2003 ; Jannoo *et al.* 2007).

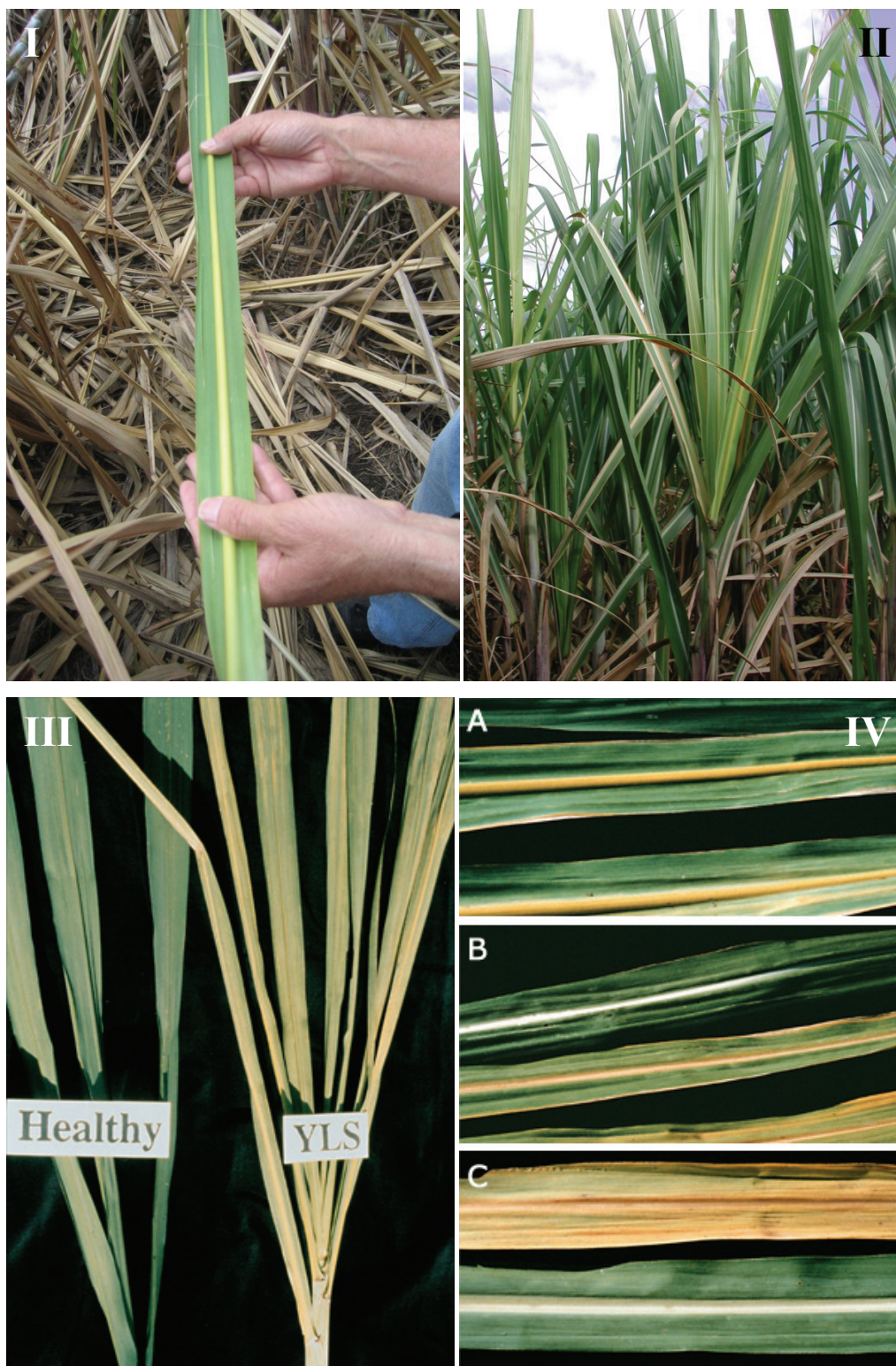


Figure II.1 : Symptômes de maladie de la feuille jaune. I : jaunissement de la nervure centrale d'une feuille (Guadeloupe) ; II : touffe de canne à sucre contaminée par la maladie (Maurice) ; III; feuilles saines (« healthy ») et contaminées (« YLS ») ; IV: variabilité de l'intensité des symptômes.

Crédits : photos I et II : L. Costet (CIRAD) ; photos III et IV : American Phytopathological Society.

II La maladie de la feuille jaune

1. Généralités

La maladie de la feuille jaune, ou Yellow Leaf Disease, est une virose affectant la canne à sucre, aujourd'hui décrite sur la majeure partie de son aire de répartition (Abu Ahmad *et al.* 2006a). Elle est généralement caractérisée par un jaunissement progressif de la nervure centrale des feuilles à partir de l'extrémité, pouvant conduire à des nécroses (Rott *et al.* 2008). Cependant, les symptômes ne sont pas visibles de façon systématique, en particulier sur les jeunes pousses (**figure II.1**). Sa première description date de 1989 où les premiers symptômes de jaunissement ont été observés à Hawaï sur une variété locale (Schenck 1990 ; Schenck 1997). La maladie a rapidement été décrite dans d'autres pays (Comstock *et al.* 1994 ; Lockhart *et al.* 1996) avant de devenir un enjeu économique à partir de la fin des années 90, notamment au Brésil (Vega *et al.* 1997), précipitant les recherches pour découvrir son agent causal et en caractériser l'épidémiologie. Si la découverte de la maladie puis la description de son agent causal sont récentes, des symptômes similaires sont connus depuis longtemps, regroupés sous des appellations variables, comme le « yellow wilt » décrit en Afrique dans les années 1960 (Ricaud 1968). Une étude récente suggère que le virus a été introduit à Hawaï dans les années 60 (Komor *et al.* 2010). A la Réunion, la première détection confirmée de la maladie a eu lieu en 1996, mais il est probable qu'elle y ait été présente plusieurs années auparavant (Rassaby *et al.* 1999 ; Abu Ahmad *et al.* 2006a).

2. Agent causal : le *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV)

2.1 Historique

La première observation d'un agent pathogène susceptible d'être responsable de la maladie a été faite en 1994 : il semblait alors s'agir d'un virus à ARN double brin (Borth *et al.* 1994) ; par la suite, des particules icosaédriques ont été observées dans les cellules compagnes et dans des extraits purifiés de feuilles de plantes infectées. Ces particules, de nature virale, ont ensuite été rapprochées de la famille des Luteoviridae - virus à ARN simple brin - par des tests sérologiques (Scagliusi et Lockhart 1997 ; Vega *et al.* 1997 ; Scagliusi et Lockhart 2000), et le virus a été baptisé *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV). Le SCYLV a d'abord été associé au genre *Luteovirus* sur la base d'affinités sérologiques et d'une comparaison de

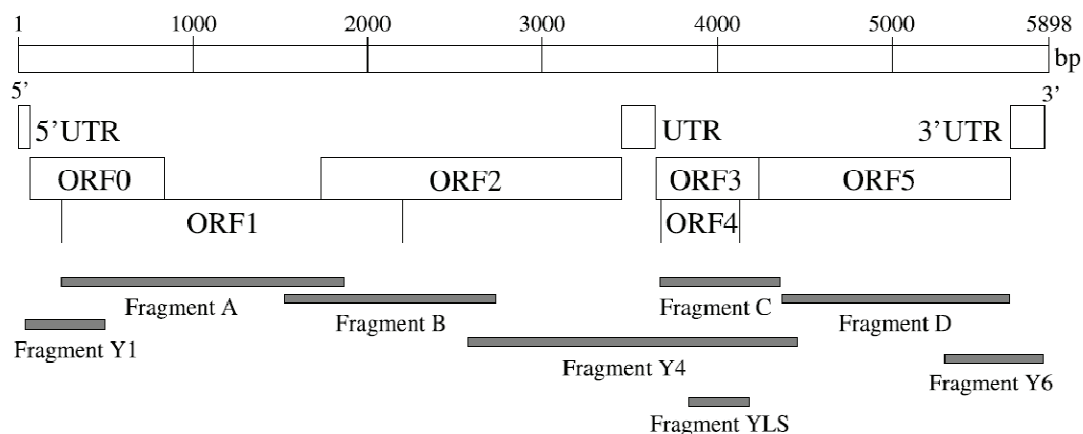


Figure II.2 : Organisation type d'un génome du SCYLV (Abu Ahmad et al. 2006). 5'UTR : région 5' non traduite ; ORF : cadre ouvert de lecture ; fragments : emplacement des amorces utilisées en typage et phylogénie.

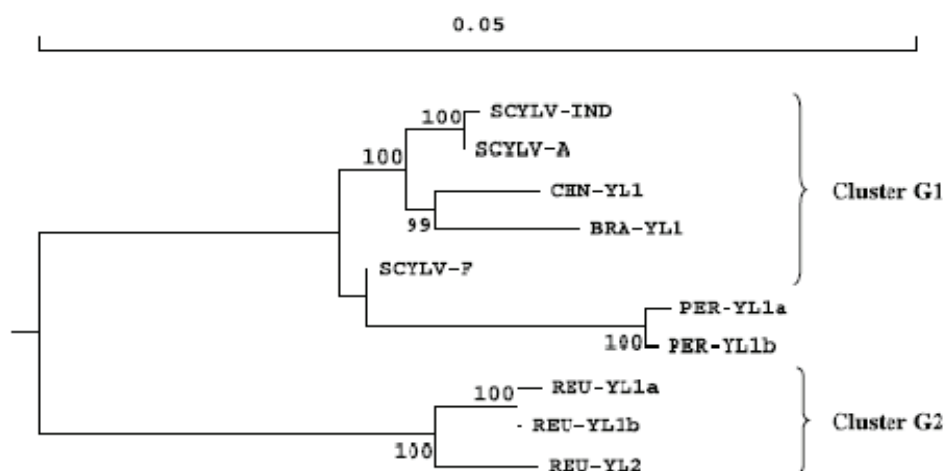
séquences avec le *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) (Irey *et al.* 1997). Une analyse plus poussée des ORFs (Smith *et al.* 2000) a montré que son génome était un assemblage recombinant de différentes espèces virales, partageant le plus de caractéristiques de séquence avec le genre *Polerovirus*, dans lequel le SCYLV est désormais classé par le comité international de taxonomie des virus (D'Arcy et Domier 2005). Par ailleurs, la proximité avec le BYDV n'est pas uniquement structurelle, puisque deux de ses espèces vectrices, *Melanaphis sacchari* (Zehntner) et *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) sont communes aux deux virus (Blackman *et al.* 1990), les Luteoviridae étant exclusivement transmis par pucerons. La transmission du virus à des plantes saines par l'intermédiaire de pucerons ayant acquis le virus sur des plantes infectées permet de reproduire les symptômes sur la plante saine (Scagliusi et Lockhart 2000). L'origine exacte du virus est inconnue, mais il est probable qu'il soit apparu par recombinaison entre plusieurs membres des Luteoviridae : *Polero*-, *Luteo*- et *Enamovirus* avec lesquels le SCYLV partage des caractéristiques de séquence (Smith *et al.* 2000). L'analyse de la diversité génétique des populations américaines du virus suggère une origine sud américaine, probablement en Colombie où la plus grande diversité génétique a été observée (Moonan et Mirkov 2002). Cette population colombienne, dite C-population, diverge des autres isolats du virus et occupe une place intermédiaire dans la phylogénie entre le SCYLV et les autres membres du genre *Polerovirus*.

2.2 Caractéristiques moléculaires du virus

Le SCYLV présente des caractéristiques propres au genre *Polerovirus* : c'est un virus à ARN simple brin monopartite, encapsidé non enveloppé, et de forme icosaédrique. Il est transmis par puceron sur le mode circulant non propagatif, infecte les cellules compagnes du phloème, et circule dans les tubes criblés de sa plante hôte.

L'analyse de la première séquence virale disponible, longue de 5895pb, a été réalisée par Smith *et al.* (2000) à partir d'un isolat floridien baptisé SCYLV-F. Le génome se subdivise en 6 cadres ouverts de lecture (ORFs) notés 0 à 5 et codant pour 7 protéines au moins (**figure II.2**). Les ORFs 0, 1 et 2 sont exprimés par traduction directe de l'ARN génomique alors que les ORFs 3, 4 et 5 sont traduits à partir d'un ARN subgénomique. Le rôle de la plupart de ces ORFs a été élucidé avec plus ou moins de précision :

- Les ORFs 1 et 2, caractéristiques partagées avec le *Potato leafroll virus* (PLRV), coderaient pour une protéase à sérine et une protéine virale putative reliée au génome (VPg) pour l'ORF 1, et une RNA polymérase RNA-dépendante (RdRp) pour l'ORF 2. Les deux ORFs sont vraisemblablement traduits simultanément pour aboutir à une



	G1	PER-YL1	G2
G1	98.6-99.9		
PER-YL1	96.7-98.5	99.8	
G2	94.2-95.5	93.9-94.1	98.9-99.8

Figure II.3 : Phylogénie des principaux isolats de SCYLV décrits (Abu Ahmad et al. 2006)

Haut : NJ-tree basé sur une séquence de 5 ORFs (5612pb au total)

Bas : pourcentage d'identité entre clusters d'isolats.

protéine de fusion qui serait ensuite clivée. Cependant, les différences de structure de la molécule d'ARN à ce locus suggèrent que la régulation de la traduction des deux ORFs chez le SCYLV pourrait être différente de celle des autres virus de la famille.

- Les ORFs 3 et 4, calqués sur ceux du BYDV, codent respectivement pour la protéine de capsid (CP) et une protéine de mouvement (MP) qui facilite le mouvement des particules virales entre les plasmodesmes (Miller et Rasochová 1997).
- L'ORF 5, proche de celle du *Pea enation mosaic virus* (PEV), code pour une protéine de translecture (RT, read-through protein) qui permet d'empêcher le ribosome de décrocher après un codon stop, et pouvoir ainsi poursuivre la traduction de l'ARN pour obtenir une protéine de fusion (Albouy *et al.* 2001).
- La protéine P0 (ORF0) a récemment été identifiée comme responsable de la suppression du PTGS (extinction génique), et est capable d'induire la mort cellulaire, ce qui est une caractéristique unique parmi les *Polerovirus* (Mangwende *et al.* 2009). Elle agirait en déstabilisant la protéine Argonaute, impliquée dans le clivage des ARN double brin lors de la régulation de la transcription, et empêcherait ainsi la cellule de pouvoir détecter et cliver les ARN viraux.

2.3 Diversité virale

Plusieurs équipes ont étudié la diversité génétique du SCYLV (Borg *et al.* 2001 ; Moonan et Mirkov 2002 ; Abu Ahmad *et al.* 2006a) (**figure II.3**); ces études ont permis de décrire quatre types d'isolats : REU (Reunion), BRA (Bresil), PER (Perou) et CUB (Cuba). Deux nouveaux génotypes, IND (Inde) et CHN (Chine), ont été récemment décrits (Viswanathan *et al.* 2008 ; Wang et Zhou 2010). Des méthodes de détection et de quantification du virus basées sur une technique immunologique (Schenck *et al.* 1997) et sur une RT-PCR (Irey *et al.* 1997 ; Korimbocus *et al.* 2002) ont rapidement été mises au point. Abu Ahmad *et al.* (2006b) ont étudié pour 18 régions du monde la répartition des quatre génotypes REU, CUB et BRA/PER. Ces deux derniers génotypes proches phylogénétiquement n'ont pas pu être distingués par les amorces PCR utilisées dans cette étude. La majorité des zones géographiques n'étaient infectées que par un génotype viral. Le génotype BRA/PER était présent dans toutes les zones de culture indexées, alors que chacun des génotypes REU et CUB n'étaient présents que dans quatre zones. Seuls les génotypes REU, majoritaire sur l'île, et BRA/PER, présent sur quelques accessions en collection ont été à ce jour identifiés à la Réunion. Une variabilité de la virulence entre génotypes viraux a été démontrée lors de tests de transmission sur des vitroplants réalisés sur 8 cultivars (Abu Ahmad *et al.* 2007). Il est notamment apparu que le

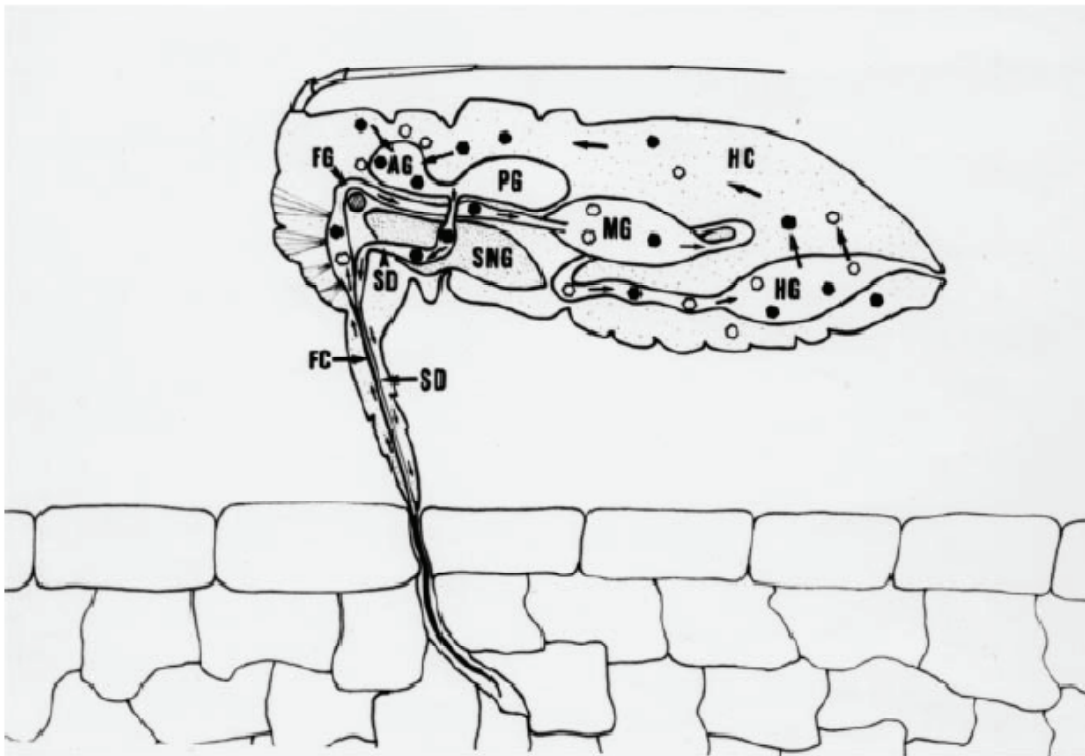


Figure II.4 : Mécanismes d'acquisition et de transmission d'un lutéovirus par puceron (d'après Gray and Gildow 2003).

« Les particules virales ingérées remontent le long du canal alimentaire (FC), puis à travers le cibarium (FG), et s'accumulent dans l'intestin médian (mesenteron, MG) ou postérieur (proctodeum, HG). Le virus transite ensuite vers l'hémocèle (HC), où il peut s'accumuler et rester viable pendant plusieurs semaines. Les particules transmissibles (hexagones noirs) sont transportées dans les glandes salivaires accessoires (AG), mais ne s'associent pas aux glandes salivaires principales (PG). Ces particules sont alors injectées dans la plante via le canal salivaire (SD) quand le puceron s'alimente dans le phloème. »

génotype BRA/PER possède un pouvoir pathogène supérieur au génotype REU, possédant une plus grande capacité à être transmis, et pouvant infecter un plus grand nombre de cultivars. De plus, des différences de capacité à induire des symptômes ont été mises en évidence : les symptômes caractéristiques de jaunissement de la feuille apparaissent beaucoup plus rarement sur cultivars sensibles lors d'infections par le génotype REU.

Cependant, l'évaluation de l'impact de la variabilité virale sur l'expression la maladie nécessite d'autres études : la reproductibilité des réponses à l'infection virale peut en effet dépendre de facteurs tels que le stade de développement de la plante ou les conditions de culture (Rott *et al.* 2008).

2.4 Mode de transmission

A l'instar des autres membres de la famille des Luteoviridae, le SCYLV est transmis sur le mode circulant, ce qui est une caractéristique typique des virus de phloème (**figure II.4**). A la différence des virus non-circulants. Il est donc nécessaire que le puceron s'alimente pendant une durée suffisante pour atteindre le phloème afin d'acquérir ou transmettre des particules virales (Katis *et al.* 2007). L'acquisition se fait sur le mode dit 'non-multipliant', ce qui signifie que les particules virales ne se répliquent pas dans le puceron. Ce mode d'acquisition est non pathogène pour le vecteur et n'a donc pas d'incidence sur sa fitness (Feres et Moreno 2009). L'efficacité de la transmission est proportionnelle au temps passé par le puceron sur la plante source (Tanguy et Dedryver 2009). L'acquisition se fait en trois temps : après avoir été ingérées depuis le phloème, les particules virales doivent traverser la paroi de l'intestin puis transiter dans l'hémocèle, pour finalement rejoindre les glandes salivaires accessoires. Le passage dans l'hémocèle se fait par endocytose, puis exocytose successives à partir de l'intestin (Hogenhout *et al.* 2008). Ce phénomène est appelé trans-cytose, et est conditionné par de nombreux facteurs inhérents au puceron. Ce processus est souvent espèce, voire clone-spécifique, c'est-à-dire que plusieurs facteurs génétiques, probablement exprimés dans l'intestin du puceron, sont impliqués dans la capacité des particules virales à traverser la paroi de l'intestin pour rejoindre l'hémocèle puis les glandes salivaires (Peiffer *et al.* 1997). Quatre protéines impliquées dans l'interaction avec le *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV, genre *Polerovirus*) ont été isolées chez *Schizaphis graminum* (Rondani) par coprécipitation avec des particules virales. Deux de ces protéines ont été identifiées et codent pour une luciférase et une cyclophiline qui seraient des protéines impliquées dans le transport de macromolécules, d'autres ont une fonction inconnue (Yang *et al.* 2008). Lors de l'interaction entre *Myzus persicae* (Sulzer) et le *Beet western yellows virus* (BWYV, genre *Polerovirus*),

plusieurs polypeptides interagissant avec le virus ont été isolés, et trois ont été identifiés : RACK1, l'actine et GAPDH3. Ce dernier, qui a déjà été impliqué dans les mécanismes d'endo et exocytose, est un bon candidat pour être le récepteur membranaire des phénomènes de trans-cytose (Seddas *et al.* 2004).

D'autres facteurs propres au virus et au puceron sont susceptibles d'influencer l'efficacité de l'acquisition et de la transmission du virus (Gray et Gildow 2003). Parmi eux, la présence de bactéries endosymbiotiques du genre *Buchnera* (Buchner) est susceptible de conditionner l'efficacité de la transmission (van den Heuvel *et al.* 1994). Les particules virales du genre *Luteovirus* sont ainsi capables d'interagir in vitro avec une protéine synthétisée par les bactéries, la symbionine, un analogue à la chaperonine GroEL d'*Escherichia coli* (Migula) (Filichkin *et al.* 1997) ; si cette interaction est possible in vivo, elle pourrait permettre de faciliter la progression des virus dans le puceron, depuis le tube digestif vers les glandes salivaires accessoires, en leur permettant de ne pas être reconnus par le système immunitaire, ou bien en facilitant directement leur passage vers le système salivaire (Cilia *et al.* 2011). D'autres travaux suggèrent que GroEL n'est pas capable d'interagir in vivo avec les particules virales, récusant ainsi le rôle du symbiote dans le processus d'acquisition (Bouvaine *et al.* 2011).

Outre la transmission par insecte vecteur, le SCYLV se propage via la plantation de boutures infectées. Sachant que la canne à sucre est multipliée uniquement par boutures, ce mode de transmission joue un rôle fondamental dans l'épidémiologie de la maladie. La transmission par graines n'est pas connue chez les lutéovirus (Brault *et al.* 2001), et n'a jamais été mise en évidence pour le SCYLV (Rott *et al.* 2008).

2.5 Espèces vectrices

Trois espèces de pucerons ont été montrés capables de transmettre le SCYLV à la canne à sucre et de provoquer des symptômes sur une plante saine : *Melanaphis sacchari*, *Rhopalosiphum maidis* et *Ceratovacuna lanigera* (Zehntner) (Scagliusi et Lockhart 2000 ; Schenck et Lehrer 2000 ; Zhou *et al.* 2006). Une quatrième espèce, *Rhopalosiphum rufiabdominalis* (Sasaki), a été capable de transmettre le virus à des plants de blé, mais pas à la canne à sucre, probablement à cause de son faible taux de survie sur canne (Schenck et Lehrer 2000). Des quatre espèces, seules les deux premières sont présentes à la Réunion et observées dans les cultures de canne à sucre (Rassaby *et al.* 2004). Des comparaisons d'efficacité de transmission ont été effectuées entre les deux espèces : il apparaît que *M. sacchari* est un vecteur plus efficace que *R. maidis* (Schenck et Lehrer 2000). A la Réunion, le

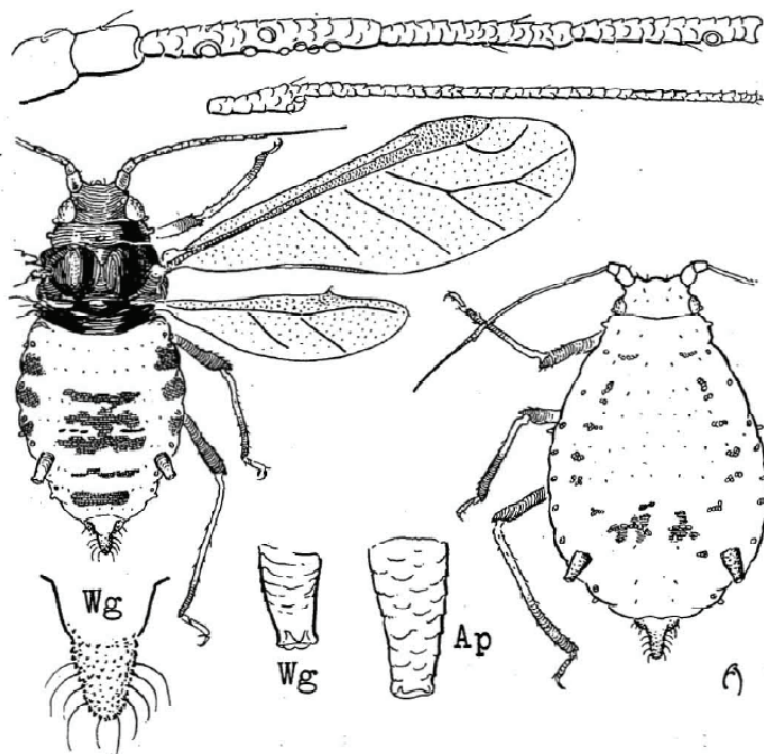


Figure II.5 : *Melanaphis sacchari*, tiré de Zimmermann (1948)



Figure II.6 : Individu virginipare aptère et larve (gauche) et colonie (droite) de *Melanaphis sacchari* sur feuille de canne à sucre (*Saccharum* sp.).

Photo : Antoine Franck (CIRAD)

rôle de *M. sacchari* dans l'épidémiologie de la maladie de la feuille jaune est également supposé plus important que celui de *R. maidis*, du fait de la faible densité de *R. maidis* sur canne à sucre et de l'absence de SCYLV dans les colonies de *R. maidis* échantillonnées à la Réunion (Rassaby *et al.* 2004).

2.6 Gamme d'hôte

Les études réalisées à ce jour révèlent que les cultivars de canne à sucre et espèces du complexe *Saccharum* (*S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *Erianthus arundinaceus*) sont les seuls hôtes connus du SCYLV en conditions naturelles (Schenck et Lehrer 2000 ; Comstock *et al.* 2001 ; Komor 2010). Aucune adventice présente en bordure de parcelle n'a à ce jour été rapportée infectée (Komor 2010). Le virus peut cependant être transmis par le puceron en conditions contrôlées sur blé, avoine, orge, riz, sorgho et maïs (Schenck et Lehrer 2000 ; Komor 2010).

3. *Melanaphis sacchari* : biologie et taxonomie

3.1 Présentation

Melanaphis sacchari (**Figure II.5**) est un petit puceron, dont les adultes aptères mesurent 1.1 à 2 mm de long (Blackman et Eastop 2006), de couleur blanc jaunâtre, parfois brun-gris, verdâtre voire rosé (**figure II.6**) ; il est présent en colonies sur la face abaxiale des feuilles les plus basses (Blackman et Eastop 2006). C'est une espèce sub-cosmopolite, que l'on trouve dans l'ensemble des régions tropicales au climat favorable à la production de canne à sucre. Comme les autres espèces de puceron, il se nourrit en prélevant la sève élaborée dans le phloème de la plante. Il peut localement proliférer (Remaudière 1985) ; cependant, aucune dégât direct n'est causé par la présence du puceron sur canne à sucre. En revanche, les dégâts indirects, liés à la transmission de virus par *M. sacchari* (par exemple : SCYLV, SCMV, ...) peuvent avoir un impact économique important. Par ailleurs *Melanaphis sacchari* est responsable de dégâts d'importance économique sur le sorgho en Afrique (Singh *et al.* 2004). *Melanaphis sacchari* est considéré comme anholocyclique sur la majorité de son aire de répartition, se reproduisant par parthénogenèse apomictique. La présence de populations holocycliques a cependant été signalée en Asie (Blackman et Eastop 2000).

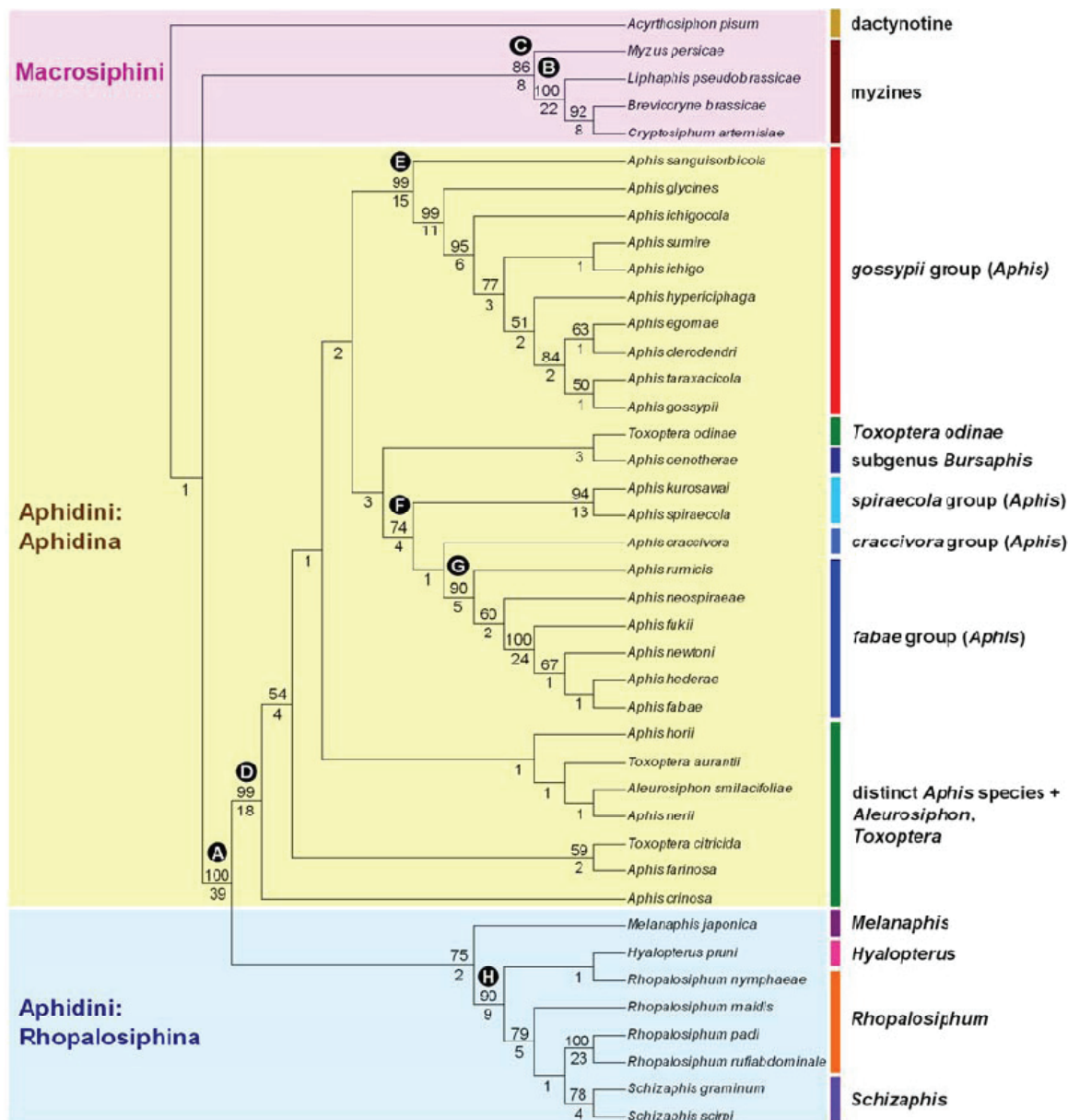


Figure II.7 : Arbre consensus de taxonomie des Aphidini basé sur des séquences mitochondriales tRNA-leucine et Cytochrome Oxydase II (Kim and Lee 2008).

3.2 Taxonomie

Le genre *Melanaphis* (Van der Goot), appartient à la sous-tribu des Rhopalosiphina, tribu des Aphidini, famille des Aphididae, super famille des Aphidoidea (pucerons), et ordre des Hemiptera (insectes piqueurs-suceurs) (**Figure II.7**). Le genre *Melanaphis* est originaire du continent Eurasién, mais a depuis été dispersé sur les cinq continents. Il est taxonomiquement proche des genres *Rhopalosiphum* (Koch) et *Hyalopterus* (Koch), dont il partage de nombreuses caractéristiques morphologiques et biologiques, notamment pour les formes holocycliques qui alternent entre une graminée comme hôte d'été, et un hôte d'hiver appartenant à la famille des Rosacées (*Prunus* pour *Hyalopterus*, Pyroideae pour *Melanaphis*, les deux pour *Rhopalosiphum*). Cependant, la plupart des espèces du genre *Melanaphis* n'ont pas d'hôte d'hiver connu, et sont donc considérées comme anholocycliques sur leur aire de répartition (Blackman et Eastop 2000). Les récentes études phylogénétiques moléculaires semblent confirmer cette proximité entre les trois genres (Coeur d'Acier *et al.* 2007 ; Kim et Lee 2008).

Depuis sa première description sous le nom « *Aphis sacchari* » en 1897 par Zehntner lors de son inventaire des insectes présents sur la canne à sucre à Java (Zehntner 1897), *Melanaphis sacchari* a été décrit sous divers noms d'espèces au sein des genres *Geoktapia* (Mordovilko), *Masraphis* (Soliman), *Schizaphideilla* (Hille Ris Lambert) et *Longuinguis* (Van der Goot) (Eastop et Lambers 1976 ; Remaudière et Remaudière 1997b). Si *Melanaphis sacchari* a longtemps été décrite comme une seule espèce présente indifféremment sur canne à sucre et sur sorgho, il semblerait toutefois que plusieurs formes coexistent sur canne à sucre et espèces proches, au sein d'un complexe taxonomiquement mal défini. Ainsi, l'espèce *Melanaphis sorghi* (Theobald, 1904) est présente en Afrique et en Asie ; on la trouverait préférentiellement sur sorgho, et occasionnellement sur canne à sucre ou maïs (Blackman *et al.* 1990). Au moins une autre espèce pourrait constituer un taxon distinct : *Melanaphis indosacchari* (David, 1956) présente sur canne à sucre où elle est parfois trouvée en mélange avec *M. sacchari*. Les statuts respectifs de ces 'entités taxonomiques' restent imprécis : placées en synonymie de *M. sacchari* par Remaudière et Remaudière (1997a), elles sont considérées comme espèces distinctes par Blackmann et Eastop (2006). Leur identification, basée sur des critères morphologiques fins (Blackman et Eastop 2006), est nécessaire pour définir les forces en présence dans le pathosystème : en particulier, les capacités vectorielles pourraient varier d'un taxon à l'autre (Blackman et Eastop 2007), ce qui revêtirait une importance certaine dans l'épidémiologie de la maladie de la feuille jaune.

4. Importance économique de la maladie

Le SCYLV peut causer des pertes de rendements, qui peuvent cependant passer inaperçues car les symptômes de la maladie (jaunissement des feuilles) sont peu caractéristiques. Les pertes de rendements peuvent ainsi survenir chez les cultivars sensibles même si les plants ne présentent pas de symptômes, tandis que certains cultivars tolérants ne présentent pas d'effets sur le rendement bien qu'infectés par le virus (Grisham *et al.* 2001 ; Rassaby *et al.* 2003). Les principaux effets de la maladie se mesurent sur la surface foliaire et la concentration de chlorophylle dans les feuilles, le nombre de tiges usinables, la teneur en sucre ou encore le transport des sucres (Grisham *et al.* 2001). Au Brésil, au début des années 90, la maladie de la feuille jaune a provoqué des pertes de rendement de l'ordre de 40-60% pour le cultivar SP 71/6163 (Lockhart et Cronjé 2000). Ce cultivar qui était planté sur 750.000 hectares a alors dû être retiré de la production (Vega *et al.* 1997). Une étude a évalué en Floride la perte de rendement en sucre due à la maladie de la feuille jaune à 15% sur certains cultivars (Flynn *et al.* 2005). A Hawaï, Lehrer *et al.* (2009) ont évalué sur une variété locale que la présence du virus affectait le nombre de tiges usinables, la biomasse et le rendement en sucre, qui diminuaient respectivement de 20, 29 et 26%. Une autre étude a montré que les pertes de rendements, notamment la réduction de la biomasse et de la quantité de sucre, dépendaient en partie de la quantité de virus présente dans la plante (Zhu *et al.* 2010).

A la Réunion, les premières études concernant la maladie de la feuille jaune ont montré que les quatre variétés cultivées sur l'île (R 570 ; R 575 ; R 577 ; R 579) étaient sensibles à la maladie, trois d'entre elles (R 579, R 577 et R 575) subissant des pertes de rendement. Pour la variété R 577, ces pertes peuvent atteindre 37% de la biomasse totale, une réduction de 28% du poids des tiges et une diminution de 11% de la richesse en sucre (Rassaby *et al.* 2003).

5. Résistance variétale à la maladie de la feuille jaune

Actuellement, parmi les moyens de lutte disponible contre la maladie de la feuille jaune aucun n'est réellement satisfaisant. Le traitement des boutures par thermothérapie est inefficace pour éliminer le virus (Chatenet *et al.* 2001 ; Moutia et Saumtally 2001 ; Comstock et Miller 2004). L'assainissement par culture de tissus est possible (Chatenet *et al.* 2001 ; Fitch *et al.* 2001 ; Parmessur *et al.* 2002), cependant cette stratégie est longue et coûteuse. De plus, elle n'est

pas envisageable pour les variétés les plus sensibles qui sont très rapidement réinfectées au champ (Rassaby *et al.* 2004). La lutte chimique contre le vecteur est également difficilement envisageable sur le plan technique et économique. A long terme la résistance variétale semble être le seul moyen de lutte efficace et économiquement envisageable.

Les différences de taux d'infection par le SCYLV entre les différentes espèces de *Saccharum* ont été étudiées dans plusieurs régions (Schenck et Lehrer 2000 ; Comstock *et al.* 2001 ; Victoria *et al.* 2005 ; Komor 2010). Entre 60 et 70% des clones de *S. officinarum* et *S. sinense* sont infectés par le virus, alors que cette proportion ne représente que de 7 à 30% des clones d'*Erianthus* spp. ou de *S. spontaneum*. Cette dernière espèce constitue un potentiel important pour l'amélioration variétale de la résistance. On constate également que 30% des clones commerciaux ne sont pas infectés par le virus après plusieurs années de plantation, ni après infection avec des pucerons virulifères (Schenck et Lehrer 2000 ; Komor 2010). Il existe donc un potentiel de résistance au sein du germplasm cultivé qui doit être exploitable en sélection. A la Réunion, MQ 76/53, un ancien cultivar australien, est encore indemne de virus après de nombreuses années de culture en conditions d'infestation naturelle. L'analyse de la sensibilité de 200 clones issus de la descendance R 570 (sensible au SCYLV) x MQ 76/53 a permis de caractériser un QTL majeur de résistance à la maladie chez MQ 76/53 (Costet, in prep). Le cultivar MQ 76/53 est par ailleurs très sensible à *M. sacchari*, ce qui suggère que cette résistance est plutôt associée à la réplication ou à la propagation du virus.

La résistance aux insectes vecteurs est décrite comme une composante non négligeable de la résistance de la plante aux maladies transmises par insecte. Son importance dans l'épidémiologie des maladies a été étudiée au travers de son impact sur la transmission des particules virales (Delatte *et al.* 2006). Tanguy et Dedryver (2009) ont par exemple mis en évidence l'effet de la résistance au vecteur sur la durée d'acquisition (AAP) et d'inoculation (IAP) nécessaires à la transmission efficace du virus. Chez la canne à sucre, des différences de préférence de *M. sacchari* pour certains cultivars, associées à des mécanismes de résistance modérés, ont été mises en évidence (White 1990 ; Akbar *et al.* 2010). Akbar *et al.* (2010) ont étudié le comportement de *M. sacchari* sur cinq cultivars ; ils ont observé chez un cultivar une résistance par antibiose se traduisant par une réduction des performances biotiques du puceron de 50%. En revanche, aucune différence de préférence de *M. sacchari* n'a été pu être observée lors de tests d'antixénose pour ces travaux. L'exploration du germplasm cultivé présent à la Réunion pourrait donc permettre l'identification de sources de résistance utilisables en sélection et ouvrirait la voie à la recherche de marqueurs moléculaires liés à la réduction de l'infestation au champ par le puceron.

III Résistance des plantes aux pucerons

1. Généralités sur les résistances

Il est généralement admis que la fitness d'une lignée de pucerons dépend de sa capacité à exploiter les ressources disponibles (Powell *et al.* 2006). Ainsi, chaque mécanisme inhérent à la plante permettant de ralentir ou d'empêcher l'accès de l'insecte à la sève élaborée est une composante de la résistance qu'il est envisageable de caractériser et d'exploiter dans un contexte de résistance variétale. Painter (1951) a décomposé la résistance des plantes aux insectes en différentes classes de mécanismes ayant un effet direct ou indirect sur la fitness de l'insecte. La publication de Painter traite de résistance aux insectes au sens large, et les trois représentations de résistance qu'il propose peuvent être interprétées et adaptées selon le modèle plante/insecte étudié, en particulier au mode d'alimentation de l'insecte. Elles sont ainsi déclinées en trois composantes principales :

- La non-préférence, qui désigne l'ensemble des mécanismes de la plante qui entraînent le rejet de l'hôte par l'insecte et empêchent la colonisation. Kogan et Ortman (1978) ont proposé le terme « antixénose », calqué sur son pendant « antibiose » pour désigner ces mécanismes.
- L'antibiose, qui affecte de façon négative les performances du puceron sur la plante, en réduisant sa capacité à croître, survivre et se reproduire.
- La tolérance, qui est la capacité de la plante à ne pas être affectée dans sa physiologie, sa croissance et son développement, malgré la présence de pucerons. C'est un concept à valeur agronomique mais sans intérêt dans le cadre d'une étude de résistance aux pucerons vecteurs, puisqu'elle n'affecte pas directement l'insecte.

Ces trois classes de mécanismes ne sont pas exclusives et peuvent être associées, ou non, dans la résistance d'un fonds génétique à une espèce de puceron, et par extension, à l'expression d'un gène de résistance. Cette classification est toujours considérée comme valide à l'heure actuelle, notamment pour caractériser les interactions plante / puceron (van Emden 2007). Les mécanismes en question englobent un grand nombre de modes d'expressions et de compartiments cellulaires de la plante qui influent sur le comportement alimentaire du puceron.

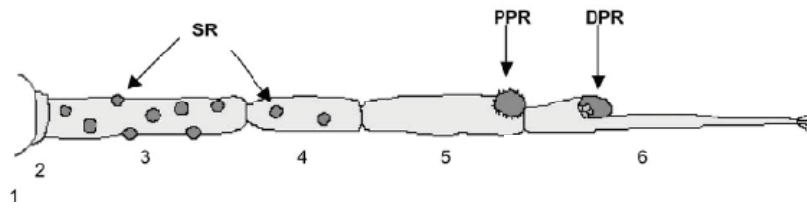


Figure III.1 : Localisation des rhinaria sur les antennes des pucerons *Aphis fabae* (Scopoli) et *Rhopalosiphum padi* (L.) selon Park & Hardie (2002). DPR: rhinarium primaire distal ; PPR : rhinarium primaire proximal ; SR : rhinaria secondaires ; 1-6 : position des segments antennaires.

2. Interactions plante – puceron et mécanismes de résistance

Dans leur revue, Powell et al. (2006) dénombrent six phases successives au cours desquelles les organes sensoriels du puceron entrent en contact avec des déterminants de la plante liés à la reconnaissance. Chacune de ces phases implique des mécanismes qui sont du ressort de l'antixénose, de l'antibiose, ou des deux. Une incompatibilité lors d'une seule de ces phases suffit à déterminer une réaction non-hôte, et entraîner le départ du puceron. Walling (2008) propose une revue détaillée de ces interactions, et fait le point sur les stratégies déployées par le puceron pour déjouer les mécanismes de résistance de la plante.

2.1 Phase d'approche : signaux d'atterrissage

Cette première phase, qui concerne les stimuli intervenant avant que le puceron n'ait atteint la plante, ne s'applique qu'aux individus ailés. Elle englobe l'ensemble des signaux perçus en vol par le puceron qui lui permettent d'identifier un hôte. Ces signaux sont de deux natures : olfactive et visuelle.

◆ *Stimuli visuels : « approche à vue »*

La première phase de la reconnaissance plante/insecte concerne les signaux visuels captés par les pucerons qui se servent notamment du contraste entre le sol nu et les plantes cultivées pour diriger leur atterrissage (Döring *et al.* 2004). Ces stimuli sont détectés au moyen de trois types de photorécepteurs sensibles à différentes fréquences du spectre, allant de l'ultraviolet à l'infrarouge, avec une sensibilité maximale dans le vert (Kirchner *et al.* 2005 ; Döring et Chittka 2007). Il a cependant été montré que les changements de couleur des feuilles induits par l'infection par un potyvirus n'avaient pas d'incidence sur l'attractivité visuelle du piment ou du soja pour *Myzus persicae* (Sulzer) et *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (Fereres *et al.* 1999).

◆ *Stimuli olfactifs : « approche aux instruments »*

Le puceron en vol est capable de détecter des composés volatils produits par la plante, et de les traduire sous forme de signaux d'acceptation ou non-acceptation (Nottingham *et al.* 1991). Le système olfactif des pucerons repose sur deux types de récepteurs de type neuronal placés sur les antennes (**Figure III.1**), les rhinaria primaires et secondaires (Bromley *et al.* 1979 ;

Bromley *et al.* 1980). Les rhinaria primaires permettent la reconnaissance d'hôte par le biais de composés volatils, tandis que les rhinaria secondaires sont impliqués dans la détection des phéromones sexuelles (Park et Hardie 2002). Les stimuli olfactifs jouent un rôle important dans la reconnaissance de l'hôte : certains pucerons sont capables de réagir positivement ou négativement à une espèce ou un cultivar donné en fonction des composés volatils émis (Nottingham *et al.* 1991). Ces composés, pris de façon individuelle peuvent avoir un effet répulsif et c'est la combinaison de ces composés qui est susceptible d'agir comme attractif de l'insecte (Webster *et al.* 2010).

2.2 Premier contact : défenses du phylloplane

Le premier contact avec la plante, consécutif à l'atterrissage, est la plupart du temps hostile à l'arrivée du puceron sur la surface foliaire (Walling 2008). La plante dispose en effet d'un vaste panel d'outils chimiques et physiques (Müller et Riederer 2005) pour tenter de dissuader l'installation de l'indésirable. C'est ainsi que la plupart des mécanismes de résistance opposés lors de cette première étape sont du domaine de la non-acceptation, et constituent donc les principaux signaux intervenant dans la résistance par antixénose. Ainsi la première étape pour le puceron à son arrivée consiste à évaluer si le phylloplane représente un environnement favorable, et à repartir en cas de signaux contraires. Müller (1958) a notamment observé que 90 à 98% des ailés d'*Aphis fabae* repartent quelques minutes seulement après s'être posés sur un plant de *Vicia faba*. La valeur de ce taux de 'redécollage' est d'ailleurs critique dans le succès de la colonisation de la plante par le puceron, et peut suffire à expliquer d'importantes différences de colonisation entre cultivars (Van Emden, 2007).

Ce premier rideau défensif est majoritairement constitué de mécanismes aspécifiques de la plante, impliquées dans la résistance aux insectes en général.

◆ Cires épicuticulaires et métabolites secondaires

Les métabolites secondaires émis par la plante, peuvent diffuser à travers les tissus par plusieurs voies et affecter le comportement des insectes herbivores, exerçant un effet attractif ou répulsif. Ils peuvent ainsi être impliqués dans la reconnaissance d'hôte, chaque plante présentant des profils de composition et de concentration en métabolites secondaires qui lui sont propres (Tosh *et al.* 2003). Ces métabolites peuvent être émis sous forme de composés volatils, perçus lors de la phase de vol à longue distance mais aussi être présents à la surface

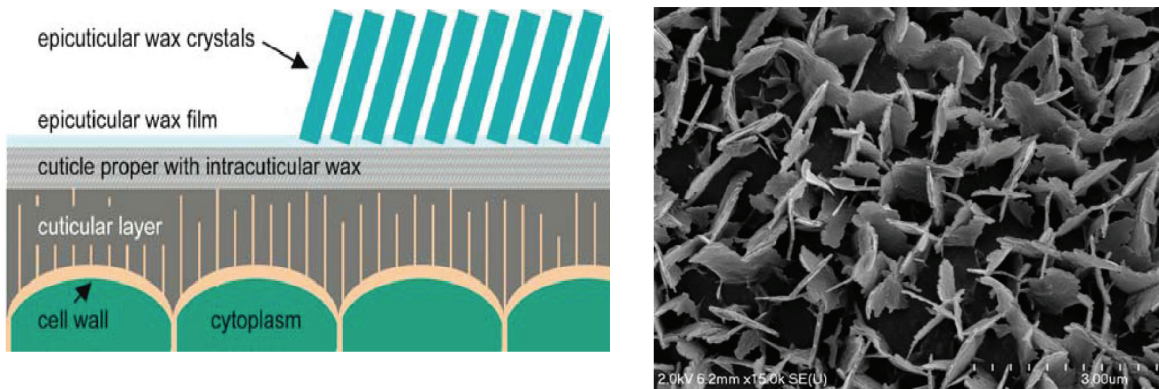


Figure III.2 : Structure schématique de la cuticule cireuse (gauche) et photo en microscopie électronique de cristaux de cire épi-cuticulaires chez le pois (*Pisum sativa*), composés principalement de 1-hexacosanol ; cette structure recouvre la face supérieure de la feuille et représente le premier contact de l'insecte avec la plante (Müller and Riederer 2005).

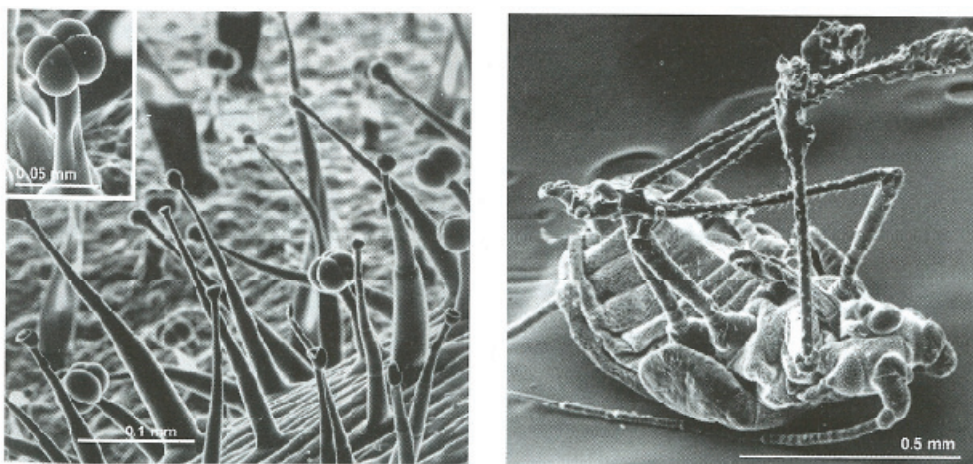


Figure III.3 : Les trichomes glandulaires : défenses aspécifiques de la surface de la feuille. Gauche : trichomes glandulaires de type IV-like et VI, dont la tête contient des métabolites secondaires (classification d'après Kang et al (2010)) ; droite : puceron englué après contact avec un composé exsudé (in van Emden (2007), d'après Gibson RW).

de la plante, dans les cires cuticulaires, ou encore exsudés par les trichomes glandulaires (Müller et Riederer 2005).

Il est à noter que les espèces de pucerons dites polyphages semblent globalement tolérantes à un plus grand nombre de classes de métabolites secondaires, mais à des doses plus faibles que les espèces monophages (van Emden 2007). Les cires de la surface de la feuille (**Figure III.2**) pourraient dans certains cas être associées à la résistance des plantes aux pucerons. Chez certaines brassicacées, des variétés cireuses présentant une forte quantité de cires épicuticulaires hébergent des populations de *Brevicoryne brassicae* (L.) réduites de 95% par rapport à des variétés à taux de cire « normal » (Stoner 1992). En revanche, des expérimentations d'élimination chimique des cires menées par Ni et al. (1998) concluent à une absence d'effet des cires épicuticulaires sur l'alimentation et la reproduction de *Diuraphis noxia* (Mordvilko) sur trois cultivars de blé, d'orge et d'avoine.

◆ Trichomes

Les trichomes, ou pilosités, sont présents à des densités variables sur les feuilles et peuvent dans certains cas contribuer à la résistance aux pucerons (**Figure III.3**). C'est le cas du blé, où la pilosité est un caractère de résistance efficace contre *Sipha flava* (Forbes), mais peu efficace contre *Schizaphis graminum* (Webster *et al.* 1994). Chez des espèces sauvages du genre *Lycopersicon* (Miller) apparentées à la tomate, la densité de certains types de trichomes est liée à la résistance à *Myzus persicae* (Simmons *et al.* 2005). Mais la pilosité des feuilles peut également avoir un effet inverse. Par exemple, chez le cotonnier, la pilosité des feuilles entraîne une plus grande sensibilité à *Aphis gossypii* (Glover) (Zarpas *et al.* 2006).

2.3 Première piqûre : goûtez avant d'entrer

La piqûre est souvent un réflexe mécanique chez le puceron, qui induit un mouvement de stylet lorsqu'il est mis en contact avec une surface solide (Hashiba et Misawa 1969) : toute surface ayant des propriétés physiques proches de celle d'une feuille peut déclencher une première piqûre d'essai. En filmant les premiers instant de l'interaction, Powell et al (1999) ont montré que cette piqûre se produit environ 20 secondes après mise en contact avec la surface de la feuille, même pour une plante qui ne sera pas reconnue comme un hôte potentiel. L'ingestion de matériel au cours de cette piqûre d'essai conditionne la suite de l'interaction : l'interprétation de ce signal par le puceron constitue le principal signal de l'acceptation ou de non-acceptation de la plante. En effet, si la préférence s'exerce dès les premières secondes de

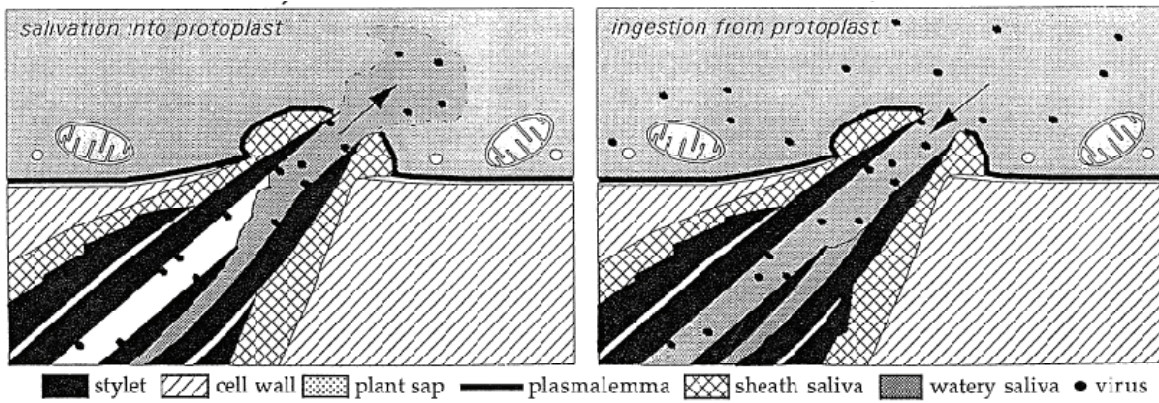


Figure III.4 : Piqûres d'essai dans le cytoplasme d'une cellule du mésophylle durant la phase de sondage (Martin et al. 1997). Gauche : sécrétion de salive aqueuse et expulsion de particules virales entraînant l'inoculation de virus non-circulants ; droite : ingestion d'une petite quantité de matériel de la cellule et acquisition de virus non-circulants

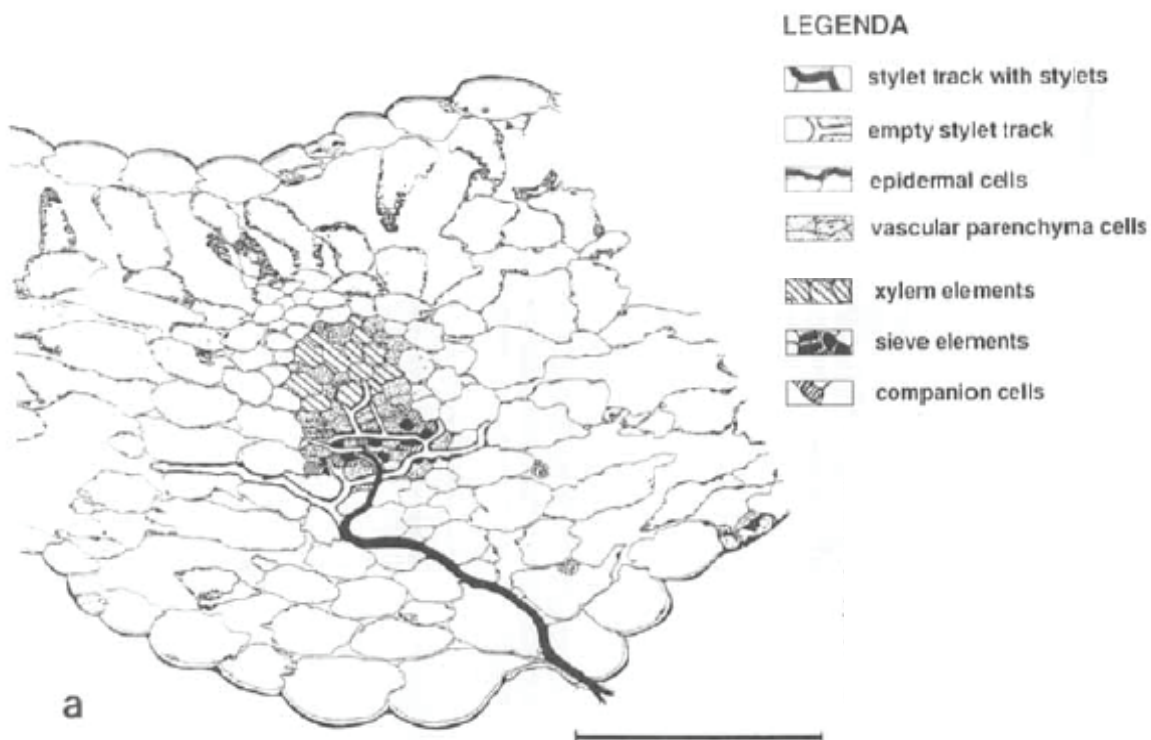


Figure III.5 : Représentation schématique du trajet des stylets dans le mésophylle (Tjallingii and Esch 1993). échelle : 100µm

l'interaction, notamment lors de la confrontation entre le puceron et les défenses physiques et chimiques présentes au niveau du phylloplane, l'acceptation dépend en revanche de l'ingestion de matériel, et conduit à l'installation et la reproduction sur l'hôte (Powell *et al.* 2006).

Afin d'évaluer le potentiel nutritif de la plante, le puceron sécrète une petite quantité de salive aqueuse qui lui permet de dissoudre les composés chimiques présents en surface et une partie du parenchyme, lui permettant d'évaluer un grand nombre de facteurs d'acceptation : présence de métabolites secondaires, de cires épi-cuticulaires, ou encore épaisseur de la paroi cellulaire (Miles 1999 ; Walling 2008). Chez les céréales, des composés de la famille des acides hydroxamiques (Hx), notamment le DIMBOA, ont un effet répulsif pour plusieurs espèces de pucerons (Argandoña *et al.* 1983 ; Givovich et Niemeyer 1995). Certains composés impliqués dans la non-acceptation, peuvent également se manifester par leur toxicité et avoir un effet d'antibiose lorsqu'ils sont ingérés par le puceron (van Emden 2007).

L'acquisition ou la transmission de virus non circulants comme le *Potato virus Y* (PVY, genre *Potyvirus*) est possible dès lors que le puceron pénètre dans une cellule du mésophylle au cours de la piqûre d'essai (Powell 1991). La transmission et l'acquisition se produisent respectivement lorsque le puceron émet de la salive ou ingère le contenu des cellules rencontrées (Martin *et al.* 1997) (**Figure III.4**) ; la transmission de particules virales associée à la salivation aqueuse lors de la première sous-phase du 'potentiel drop' a été formellement démontrée chez le *Pea enation mosaic virus* (PEMV-2, genre *Umbravirus*) (Powell 2005). D'un point de vue épidémiologique, cela signifie que l'utilisation de résistances entraînant la non-acceptation de la plante par le puceron est inefficace pour réduire la transmission de virus non-circulants (Feres et Moreno 2009) ; en effet, dans certains cas, cette première piqûre est inévitable même en présence de facteurs répulsifs puissants (Griffiths *et al.* 1982).

Chez *Aphis fabae*, le réflexe de redécollage des ailés gynopares est notamment conditionné par cette première piqûre et se produit moins de cinq minutes après l'arrivée sur un hôte insatisfaisant (Powell et Hardie 2000).

2.4 Déterminants du mésophylle : progression à couvert

Après avoir percé l'épiderme, le puceron excrète de la salive visqueuse qui durcit et forme une enveloppe, la gaine sétale, dans laquelle les stylets progressent (**Figure III.5**) (Tjallingii et Hogen Esch 1993). Cette gaine isole les stylets des défenses apoplastiques, et la salive, produite en continu, polymérise avec les phénols libres du milieu intercellulaire, ce qui permettrait de limiter la reconnaissance du puceron pendant la phase de sondage (Walling

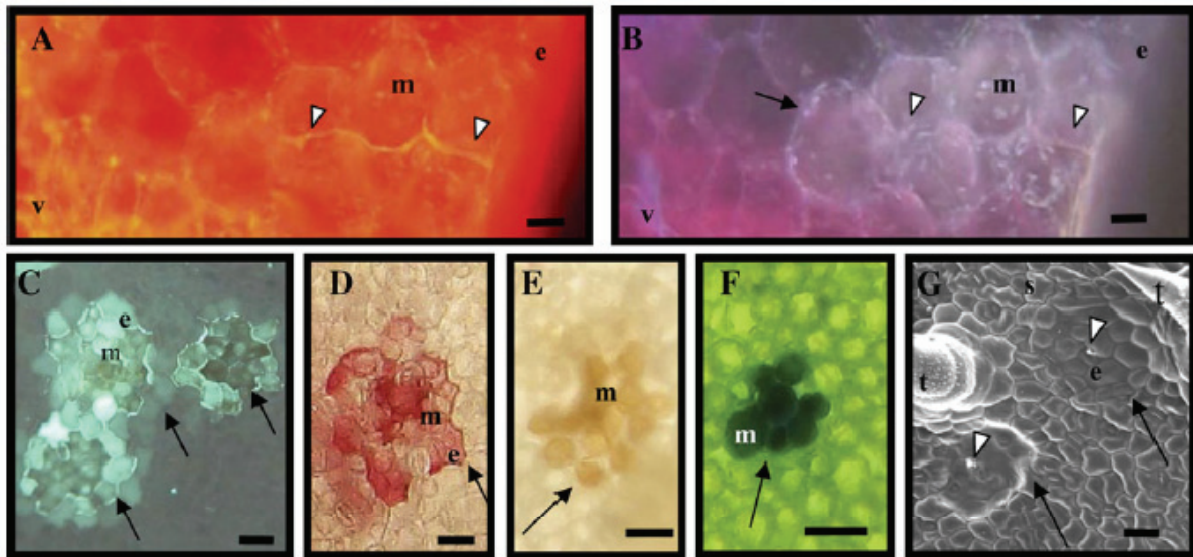


Figure III.6 : Interaction plante/puceron au niveau du mésophylle chez une variété résistante de *Cucumis melo* porteuse du gène *Vat* (Sarria et al. 2009) ; le long du trajet des stylets dans le mésophylle (A et B, flèches blanches), l'expression de la résistance entraîne des changements se manifestant par une forte autofluorescence (B, flèche noire) ; les cellules présentent des dépôts de callose (C) et de lignine (D) ; l'activité redox augmente, et une production locale de H_2O_2 (E) est observée dans les cellules endommagées (F). La mort cellulaire programmée consécutive à la HR est observée 12 heures après infestation (G, flèches noires). En blanc, le point d'entrée des stylets dans l'épiderme ; e : épiderme ; m : mésophylle ; s : stomates ; t : trichome ; v : tissus vasculaires.

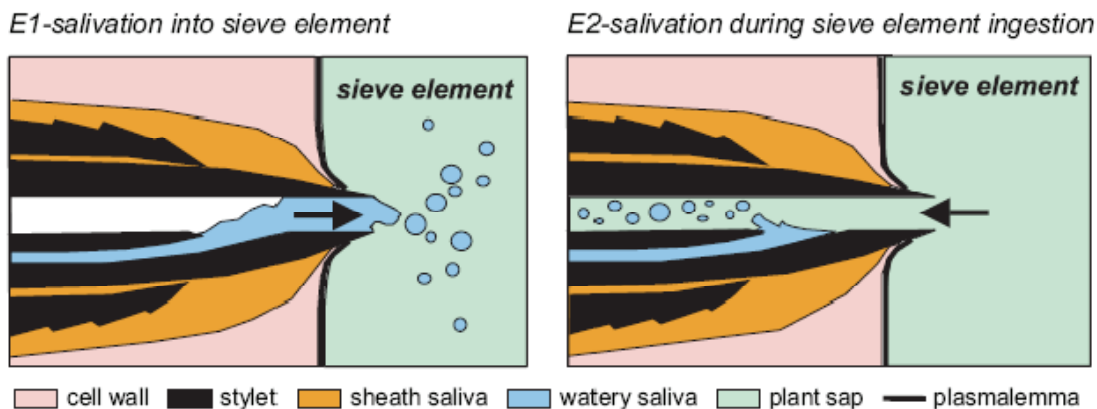


Figure III.7 : Salivation aqueuse (gauche) et ingestion passive (droite) de sève élaborée par le puceron dans le phloème (Tjallingii 2006).

2008). Au cours de leur progression intercellulaire, les stylets pénètrent fréquemment les cellules, ce qui permet au puceron d'un côté d'en 'goûter' le contenu et ainsi de s'orienter dans sa progression vers le phloème, mais peut entraîner par ailleurs le déclenchement de mécanismes de réponse aux blessures de la plante (de Ilarduya *et al.* 2003). La perforation de ces cellules génère une fuite d'électrolytes, ainsi qu'une chute du potentiel redox de la cellule. Elle s'accompagne de l'excrétion d'une petite quantité de salive par le puceron, qui permet de sceller la cellule après le retrait des stylets (Will et van Bel 2006).

En cas de reconnaissance du puceron, une interaction de type incompatible peut se produire et entraîner une réaction d'hypersensibilité, liée à l'augmentation du potentiel redox de la cellule (Smith et Boyko 2007). La production de formes actives de l'oxygène (ROS) liée à cette réaction constitue une gêne pour le puceron et peut entraîner le retrait des stylets (van Emden 2007). Ces réactions peuvent par ailleurs, à la suite de cascades de signalisation complexes, induire des réactions de défense visant à retarder la progression des stylets dans l'épiderme et le mésophylle, notamment les dépôts de callose et la synthèse accrue de lignine qui réduisent la capacité des stylets à progresser dans l'apoplasme (**Figure III.6**). Ces réactions ont été observées chez des plantes possédant le gène *Vat* ; leur apparition peut être très rapide, de l'ordre de 20 à 40 minutes après l'arrivée du puceron sur la plante (Sarria *et al.* 2009).

2.5 Première piqûre dans le phloème : « target acquired »

Les signaux gouvernant la localisation du phloème par le puceron sont nombreux et n'ont été identifiés que récemment. Si le déplacement des stylets dans les tissus de la plante est aléatoire, chaque piqûre dans une cellule est suivie de l'ingestion d'une petite quantité de matériel, qui permet au puceron d'évaluer plusieurs paramètres de la cellule cible. Les récepteurs gustatif se situent principalement au niveau du précibarium ; cette ingestion est donc nécessaire pour que le puceron puisse capter les stimuli nécessaires à son orientation. Dans un premier temps, il semble que les piqûres dans les cellules compagnes et dans le phloème soient similaires à celles se produisant dans les cellules du mésophylle pendant la phase de sondage (Pettersson *et al.* 2007). C'est en ingérant de la sève que le puceron capte des stimuli gustatifs et commence la production de salive aqueuse. Les principaux paramètres évalués et susceptibles d'induire cette phase de salivation sont le type de sucres présents et leur concentration, ainsi que le pH de la cellule (Hewer *et al.* 2010). Au-delà d'un certain seuil, les stimuli sont interprétés positivement par le puceron qui déclenche la salivation. En revanche, les signaux qui permettent de basculer entre la salivation et l'ingestion de sève élaborée sont inconnus à ce jour. Cette ingestion est un phénomène passif, et la transition

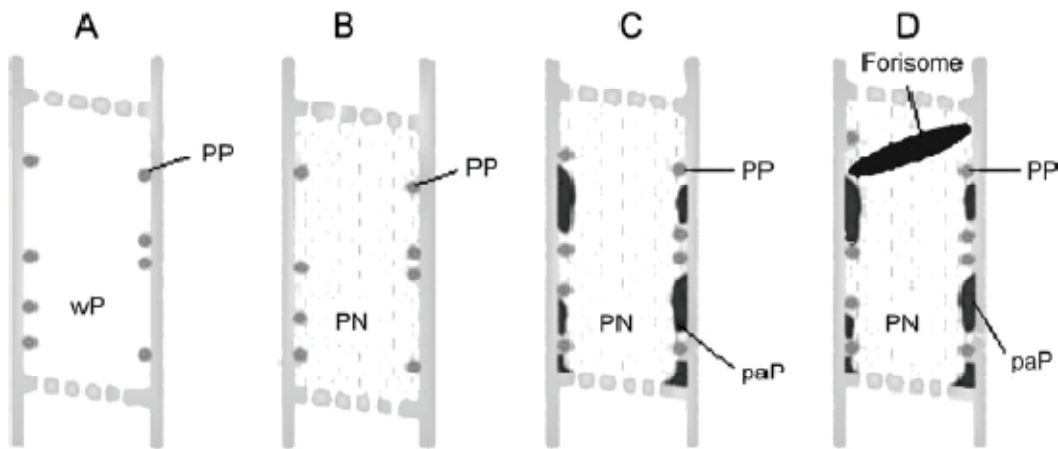


Figure III.8 : Scellage des tubes criblés par des protéines de défense, par ordre de complexité, et d'efficacité supposée (A-D). wP : protéines solubles, PN : protéines en réseau (Ehlers et al. 2000), paP : protéines pariétales, PP : P-plastids (Knoblauch and van Bel 1998). Chacune de ces structures est susceptible de contribuer à stopper le flux de sève élaborée dans le tube criblé endommagé ; l'action du forisome est complémentaire à celle des autres structures, et spécifique des légumineuses (Will and van Bel 2006).

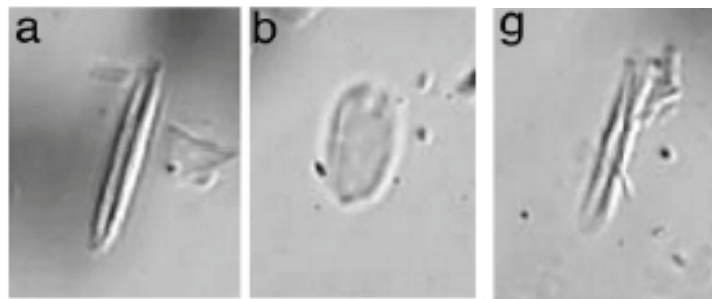


Figure III.9: Le forisome, mécanisme de résistance du phloème aux pucerons chez les légumineuses : à gauche (a), sous sa forme 'contractée' en l'absence de calcium, au centre (b), sous la forme 'dispersée' suite à un influx d'ions Ca^{2+} provoqués par une rupture du tube criblé. A droite (g), forisome 'contracté' en présence d'extrait de salive de *Megoura viciae* qui chélate les ions Ca^{2+} , provoquant un 'sabotage' des défenses de la plante (d'après Will et al. 2007).

entre salivation et ingestion s'accompagne de l'ouverture de la valve cibariale qui régule le flux de sève élaborée dans le cibarium du puceron (Tjallingii 2006) (**Figure III.7**).

C'est ensuite la pression positive du phloème qui permet l'ingestion de sève, les pièces buccales du puceron ayant uniquement un rôle de régulation du flux (Prado et Tjallingii 1994).

2.6 Ingestion dans le phloème : tromper l'ennemi, et saboter les défenses

Il est généralement admis que le phloème est le principal tissu où s'exprime la résistance par antibiose de la plante (Dogimont *et al.* 2010). La réduction, voire la suppression complète de l'alimentation dans le phloème est une des principales causes de réduction de performance des pucerons (Kaloshian *et al.* 1997 ; Klingler *et al.* 1998 ; Sauge *et al.* 1998 ; Klingler *et al.* 2005).

Tout l'art de l'ingestion phloémienne réside dans la façon de maintenir le phloème étanche, afin de maintenir un flux constant. Dans le cas contraire, l'activation des défenses de la plante menant au blocage ou à la réduction du flux dans le phloème est un frein important à l'alimentation du puceron (Will et van Bel 2006). En cas de perforation d'un des tubes criblés du phloème, un influx de calcium se produit en provenance des cellules compagnes, probablement par le biais de transporteurs mécano-sensibles. La plante réagit en scellant le tube criblé par le biais de réactions diverses, telles que la production de callose, ou le réarrangement quasi-instantané de protéines pariétales présentes dans le lumen du tube criblé (Ehlers *et al.* 2000 ; Will et van Bel 2006) (**figure III.8**). Chez les fabacées, une structure protéique particulière, le forisome, peut se dilater en présence d'un influx de calcium (Knoblauch *et al.* 2003) (**figure III.8 et 9**), et ainsi bloquer les pores du tube criblé (Will et van Bel 2006). La capacité du puceron à déjouer les réactions de défense de la plante est double. D'une part, il sécrète de façon continue de la salive aqueuse qui interagirait avec les protéines du phloème afin de maintenir la sève fluide, et empêcher le blocage du flux de sève (Will et van Bel 2006). D'autre part, il a été montré que certains composants de la salive aqueuse, dont la composition varie entre espèces de pucerons, peuvent inhiber la dilatation des forisomes en interagissant directement avec les ions calcium relâchés dans le phloème (Will *et al.* 2007). Il est également suspecté la présence d'hydrolases dans la salive, qui permettraient de dissoudre la callose qui pourrait se former sur la plaque criblée (Will et van Bel 2006). Ce véritable sabotage des voies de défense par le puceron permet de maintenir un influx constant et durable de sève élaborée vers le canal alimentaire.

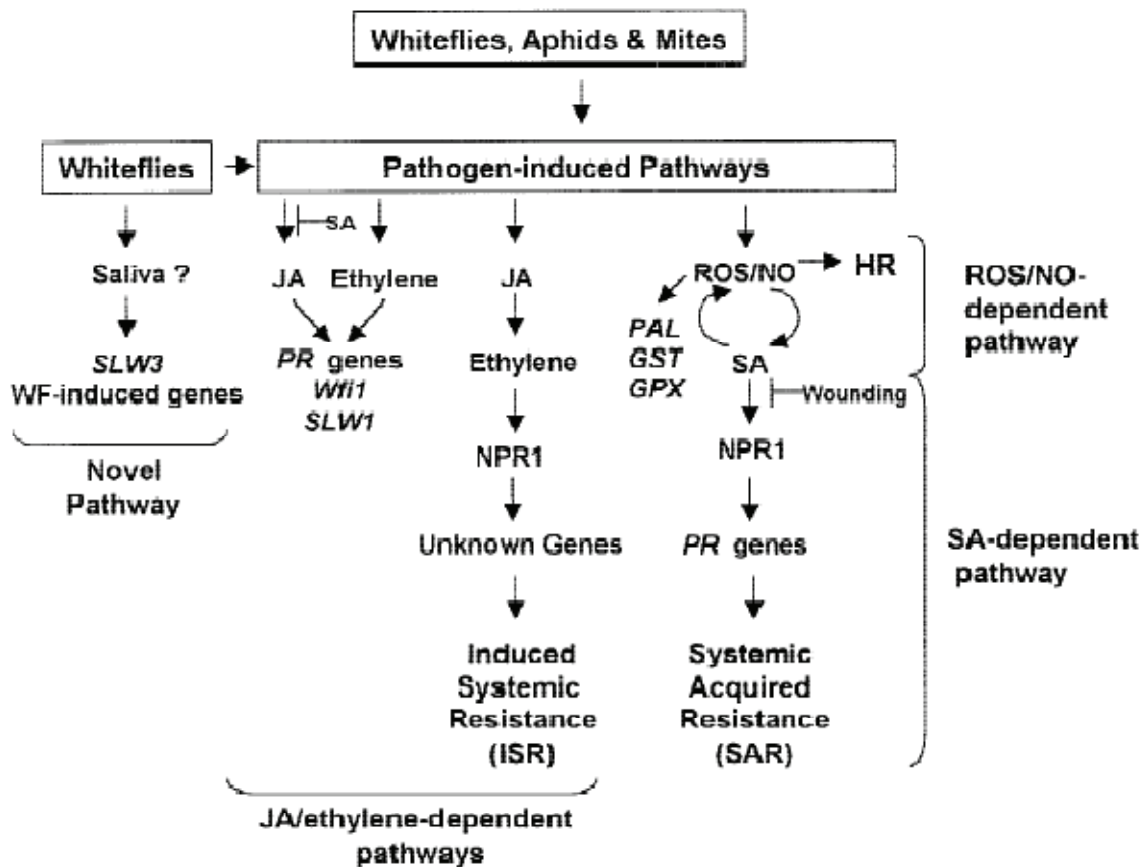


Figure III.10 : Principales voies de signalisation impliquées dans la résistance des plantes aux insectes piqueurs-suceurs (Walling 2000).

3. Bases moléculaires de la résistance aux pucerons

Depuis quelques années, de nombreux travaux sur des espèces modèles, notamment *Arabidopsis thaliana* (Moran et Thompson 2001 ; Pfalz *et al.* 2009) ou la tomate (de Ilarduya *et al.* 2003 ; Li *et al.* 2006), ont permis d'élucider les voies de signalisation impliquées dans la reconnaissance des pucerons en tant qu'agresseurs, et la mise en place des réactions de défense (Walling 2000 ; Smith et Boyko 2007 ; Walling 2008, pour l'ensemble du paragraphe). A la lumière des plus récents travaux, il semblerait que la plante puisse percevoir la présence du puceron de trois façons différentes, en détectant (1) les dommages causés aux tissus par le passage des stylets, ainsi que (2) les fuites d'électrolytes consécutives aux ponctions du contenu cellulaire par le puceron, et enfin (3) par la détection spécifique de facteurs d'avirulence du puceron (De Vos et Jander 2009). Cette détection fait intervenir le produit d'un gène de résistance de la plante, et conduit à une réaction de type incompatible. Ces trois modes de détection sont liées à des cascades signalisations, imbriquées les unes par rapport aux autres (**Figure III.10**), et relevant des voies du jasmonate (JA), du salicylate (SA) et de l'éthylène (ET). Les deux premiers types de détection concernent une interaction aspécifique, et relèvent des mécanismes de réponse aux blessures. Walling (2008) postule que la sécrétion de salive gélifiée lors de la progression des stylets dans le mésophylle a pour but de limiter la reconnaissance de tels signaux en limitant les dommages causés aux cellules par les stylets. En revanche, la détection spécifique de facteurs d'avirulence, probablement présents dans la salive du puceron (Bos *et al.* 2010), entraîne une réaction non-hôte, dont les mécanismes décrits précédemment sont à la fois plus efficaces, et plus rapidement mis en œuvre. Dans la plupart des cas, une réponse d'hypersensibilité consécutive à l'interaction plante/insecte a été décrite (Li *et al.* 2006 ; Klingler *et al.* 2009 ; Sarria *et al.* 2009). La voie métabolique la plus communément associée aux réponses de défense chez les insectes est celle de l'acide salicylique (SA), qui est typiquement associée à la résistance systémique acquise (Smith et Boyko 2007). Cela corrobore les résultats de certains travaux, notamment l'étude de la résistance chez *Medicago*, qui montrent que l'antibiose et l'effet sur le comportement alimentaire sont inductibles par une infestation préalable de la plante (Klingler *et al.* 2005). L'induction de la résistance par une infestation préalable a par ailleurs été décrite dans de nombreux modèles, mais elle n'est pas nécessairement consécutive à une reconnaissance gène à gène ; elle peut être due à l'expression de résistances tissulaires locales (Wool et Hales 1996 ; Stout *et al.* 1997), ou de facteurs phloémiens réduisant l'ingestion passive de sève élaborée (Sauge *et al.* 2002 ; Dugravot *et al.* 2007).

D'autres voies de signalisation pourraient être impliquées dans la reconnaissance du puceron, et offrent de nouvelles perspectives pour travailler sur d'autres formes de résistance aux pucerons. Sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, une voie de signalisation inédite a été récemment décrite (Pfalz *et al.* 2009) ; cette signalisation, basée sur un métabolite secondaire, l'indole glucosinate, s'est montrée efficace pour réduire les populations de pucerons, mais pas d'autres classes d'insectes. Cela montre, s'il en était besoin, la diversité des mécanismes déployés par la plante pour détecter et éliminer au plus vite les intrus, et illustre la course aux armements que se livrent les plantes et leurs bioagresseurs (Dawkins et Krebs 1979).

4. Bases génétiques de la résistance aux pucerons

Bien que des gènes de résistance et leurs mécanismes sous-jacents aient été découverts et décrits dans de nombreux modèles, les sources de résistance aux pucerons restent rares dans les pools génétiques utilisés pour l'amélioration des plantes cultivées. Les résistances aux pucerons décrites peuvent être de type monogénique, c'est-à-dire résultant de l'expression d'un seul gène de résistance dominant ou récessif, ou bien polygénique, c'est-à-dire due à l'expression conjointe de plusieurs facteurs de résistance (Dogimont *et al.* 2010).

4.1 Gènes de résistance décrits

Le premier gène à avoir été décrit et caractérisé est le gène *Vat*, impliqué dans la résistance du melon à *Aphis gossypii* (Pitrat et Lecoq 1980). Initialement sélectionné pour son effet sur la résistance au virus non persistant CMV, il est maintenant largement utilisé en amélioration variétale pour son effet drastique sur les populations de pucerons, se manifestant à la fois par de l'antibiose et de l'antixénose (Pitrat *et al.* 1982). Chez la tomate, qui est probablement le modèle qui a reçu le plus d'attention (Kaloshian et Walling 2005), la résistance au puceron *Macrosiphum euphorbiae* est due au gène *Mil* ; l'effet de ce gène n'est pas spécifique, et affecte également plusieurs espèces de nématodes (Gilbert et McGuire 1956 ; Braham et Winstead 1957), ainsi que l'aleurode *Bemisia tabaci* (Nombela *et al.* 2003). Ces deux gènes de résistance sont actuellement les seuls à avoir été clonés (Milligan *et al.* 1998 ; Dogimont *et al.* 2004 ; Dogimont *et al.* 2010).

Plusieurs autres résistances monogéniques ont été identifiées sur des modèles d'importance agronomique et économique : parmi les mieux caractérisées figurent notamment le gène *Akr* de résistance de la luzerne à *Acyrtosiphon kondoi* (Klingler *et al.* 2005), de *Prunus persicae* à *Myzus persicae* (Pascal *et al.* 2002 ; Sauge *et al.* 2002), la famille *Dn* de gènes de résistance

du blé à *Schizaphis graminum* pour la plupart introgressés depuis des espèces rustiques (*Secale cereale*, *Triticum monococcum*) (Anderson *et al.* 2003 ; Lazzari *et al.* 2009). Au total, des gènes de résistance ont été caractérisés pour une vingtaine d'espèces de pucerons, et couvrent une quinzaine de modèles d'importance agronomique (Dogimont *et al.* 2010).

4.2 Expression de la résistance

A ce jour, l'ensemble des gènes de résistance aux hémiptères identifiés codent, ou sont supposés coder, pour une protéine cytoplasmique transmembranaire de type CC (Coiled Coil)-NBS (Nucleotide Binding Site)-LRR (Leucine-Rich Repeat) (Milligan *et al.* 1998 ; Klingler *et al.* 2005 ; Wroblewski *et al.* 2007 ; Du *et al.* 2009 ; Klingler *et al.* 2009 ; Dogimont *et al.* 2010). La reconnaissance de l'éliciteur se fait soit par interaction directe avec le produit d'un gène de résistance, soit selon le 'modèle de garde', c'est-à-dire par détection du changement de conformation d'un récepteur tiers interagissant avec un facteur d'avirulence (Dangl et Jones 2001). Si la séquence protéique des domaines NBS et LRR est globalement conservée, la composition et la conformation des domaines terminaux varient entre modèles de plantes. Par exemple, le domaine terminal de la protéine encodée par *Mil* est une longue séquence riche en leucine qui aurait un rôle dans la régulation de la transduction du signal consécutif à la reconnaissance du pathogène (Hwang et Williamson 2003), alors que cette extrémité est plus courte pour le gène *Vat* (Dogimont *et al.* 2010).

Dans le cas du gène *Mil*, la découverte de nombreux facteurs nécessaires à la reconnaissance du pathogène et à la transduction du signal, témoigne d'un contrôle génétique complexe relevant probablement du modèle de garde (Kaloshian et Walling 2005).

La perception des signaux d'avirulence entraîne l'activation de cascades de signalisation différentes, puis des mécanismes de résistance spécifiques à chaque modèle plante/insecte. Ainsi, la reconnaissance par le gène *Mil* entraîne une signalisation principalement dépendante de la voie de l'acide salicylique (Li *et al.* 2006), alors que la résistance de la luzerne à *A. kondoi* conférée par le gène *Akr* dépend de celle du jasmonate (Gao *et al.* 2007). Ainsi chaque système de défense varie dans ses phases de reconnaissance, de transduction et d'expression, aboutissant à une gamme de mécanismes spécifiquement dirigés vers une espèce donnée.

4.3 Résistances polygéniques

Les résistances de type polygénique sont plus rarement citées dans la littérature. Elles ont généralement été décrites sur graminées, à l'instar de la résistance du sorgho à *Schizaphis graminum* (Agrama *et al.* 2002), ou de sources de résistance à *Diuraphis noxia* chez l'orge

(Mittal *et al.* 2008 ; Mittal *et al.* 2009), qui correspondent à des régions géniques différentes de celles où ont été cartographiés les gènes de la famille *Dn*. Chez le melon, de nouvelles sources de résistance à *Aphis gossypii* indépendantes du gène *Vat* ont récemment été cartographiées (Boissot *et al.* 2010). Cette diversification des sources de résistance, et leur utilisation conjointe dans un fonds génétique, permet d'élargir le spectre de la résistance, notamment vis à vis de biotypes potentiellement contournants.

4.4 Structure des loci de résistance

Les facteurs de résistance aux pucerons, comme les facteurs de résistances aux agents pathogènes en général, sont souvent organisés en clusters de gènes de résistance situés sur le même locus (McMullen et Simcox 1995 ; Collins *et al.* 1998 ; Hulbert *et al.* 2001). Le gène *Mil* est présent sur la branche courte du chromosome 6 de la tomate, dans un cluster qui contient plusieurs gènes de résistance à des agents pathogènes variés (Seah *et al.* 2007). Chez *Medicago truncatula*, les trois gènes décrits et cartographiés (*Akr*, *Ttr* et *Rap1*) impliqués dans la résistance aux pucerons sont concentrés sur une zone de moins de 40 cM (Klingler *et al.* 2007). Cette concentration de gènes favoriserait particulièrement l'apparition de nouveaux gènes ou allèles de résistance au cours des épisodes de remaniement chromosomique (Kanazin *et al.* 1996 ; Michelmore et Meyers 1998).

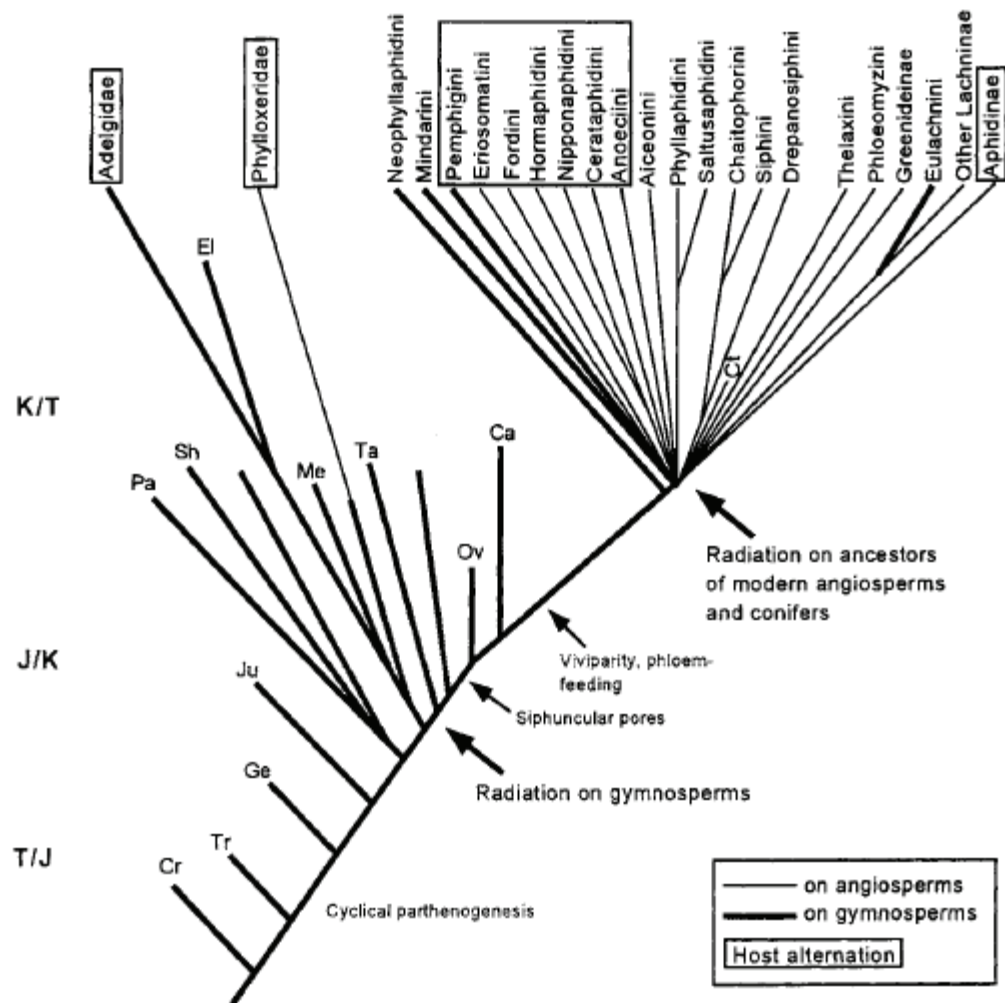


Figure IV.1 : Phylogénie ancestrale et évolution hypothétique des Aphididae (von Dohlen and Moran 2000). T/J : transition Trias/Jurassique (-203Ma), J/K : transition Jurassique/Crétacé (-135Ma), K/T : extinction Crétacé/Tertiaire (-65Ma).

Légende des taxa : Cr : Creaphididae, El : Elektraphididae, Ge : Genaphididae, Me : Mesozoicaphididae, Ov : Oviparosiphinae, Pa : Palaeoaphididae, Sh : Shaposhnikoviiidae, Ta : Tajmyraphididae

IV Spécificité des résistances et diversité génétique des pucerons

Lorsque peu de sources de résistance sont disponibles, et que la plupart de ces sources sont monogéniques, potentiellement sujettes à un contournement plus ou moins rapide, la durabilité de la résistance est une préoccupation de premier ordre (Leach *et al.* 2001). Dans ces conditions, l'introduction de nouvelles espèces de ravageurs, ou de biotypes contournant les résistances déployées, constitue une menace réelle pour les cultures (Pimentel *et al.* 2000). En effet, le succès du contournement d'une résistance déployée, résultant de l'introduction ou de l'apparition d'un génotype contournant, est avant tout lié à la capacité d'adaptation du pathogène : il est généralement admis que la probabilité d'apparition de génotypes non affectés par une source de résistance augmente avec leur potentiel adaptatif (McDonald et Linde 2002). Ainsi, l'acquisition de connaissances sur la diversité du pathogène est une composante importante de l'étude de l'épidémiologie des bioagresseurs au sens large (Grenfell *et al.* 2004 ; Huyse *et al.* 2005).

1. Diversification des pucerons : radiation et spéciation écologique

L'apparition des premières espèces de pucerons, vieille d'environ 280 millions d'années (Grimaldi et Engel 2005 ; Simon *et al.* 2010), coïncide avec celle des deux formes d'associations qui les caractérisent : celle avec leur plante hôte (Moran 1989), et celle avec les symbiotes bactériens (Moran *et al.* 1993). Leur radiation écologique et leur diversification irait de pair avec celles de leurs plantes hôtes depuis le Crétacé (**figure IV.1**); ainsi les groupes les plus ancestraux ont-ils évolué avec les Gymnospermes, alors que les familles plus récentes sont généralement spécialistes des Angiospermes (von Dohlen et Moran 2000).

Cette radiation est allée de pair avec une forte spécialisation : la plupart des espèces de pucerons sont inféodées à une seule plante hôte, ou à quelques proches parents d'une famille de plantes (Peccoud *et al.* 2010). Les plantes ligneuses sont considérées comme l'hôte primaire des pucerons, la colonisation d'espèces herbacées étant vraisemblablement plus récente (Eastop 1973 ; von Dohlen et Moran 2000).

La spécialisation d'hôte chez les pucerons est un moteur de spéciation : l'apparition de biotypes spécialistes d'une plante hôte s'accompagne d'isolement reproducteur conduisant à

HÔTE PRIMAIRE

HÔTE SECONDAIRE

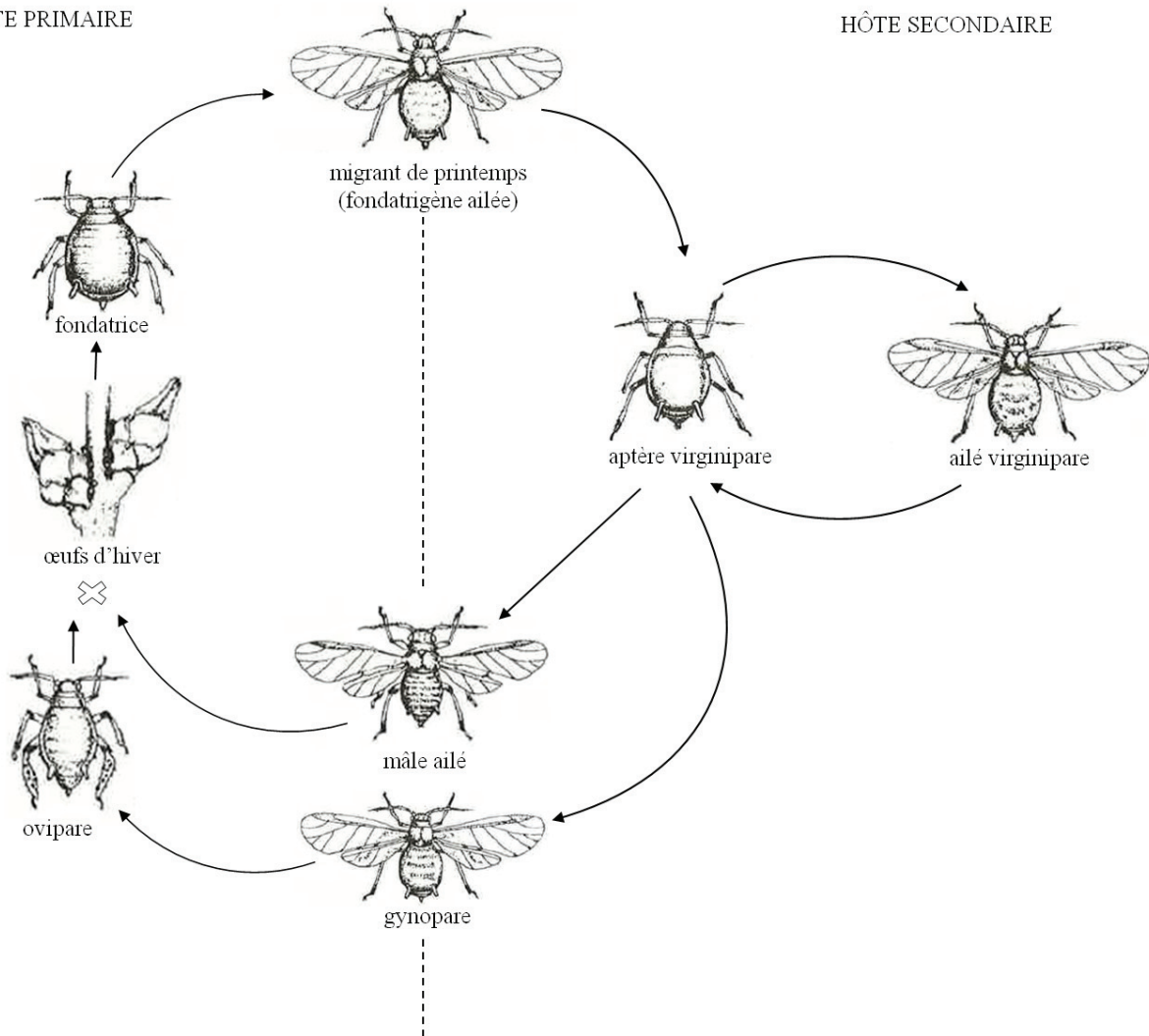


Figure IV.2 : Cycle biologique dioécique de *Aphis fabae* (d'après Blackman 1974)

Les virginipares (ailés ou aptères) sont des individus femelle pratiquant une reproduction clonale stricte sur l'hôte secondaire. En présence de stimuli adéquats (réduction de la durée du jour, baisse des températures), les virginipares donnent naissance à des migrants sexupares ailés qui rejoignent l'hôte primaire : les mâles, et les gynopares, qui donneront naissance à des femelles ovipares aptères une fois l'hôte d'hiver atteint. Après la fécondation, la femelle ovipare pond des œufs résistants au gel qui permettent à la lignée de survivre à l'hiver. Les œufs éclosent et donnent naissance à des fondatrices asexuées, qui présentent des traits de vie modifiés, notamment une plus grande fécondité. Les fondatrices engendrent des migrants de printemps ailés qui retournent à l'hôte primaire et donnent naissance à la première génération d'individus aptères virginopares.

long terme à la spéciation (Peccoud *et al.* 2009). La radiation rapide au cours du Crétacé s'est accompagnée de l'acquisition de caractéristiques du cycle biologique qui ont certainement conféré aux pucerons un avantage évolutif au cours du temps : l'alternance d'hôte, et la parthénogénèse cyclique (Blackman et Eastop 2000).

2. Cycles biologiques

Les cycles biologiques des pucerons sont séparés en fonction de deux critères : l'alternance d'hôte, et l'existence de formes sexuées conduisant à un épisode de reproduction (holocyclie). Bien que la plupart des espèces possèdent un cycle qui leur est propre, les conditions environnementales, et notamment climatiques, ainsi que des différences entre biotypes, peuvent entraîner la coexistence de plusieurs cycles au sein d'une même espèce (Williams et Dixon 2007).

2.1 Cycle avec alternance d'hôte : 'dioécie'

Le puceron alterne le cycle entre un hôte dit primaire (ancestral), généralement une plante ligneuse, où a lieu la reproduction sexuée, et un hôte secondaire, généralement une graminée, où une femelle fondatrice migrante donne naissance à une lignée parthénogénétique, qui migre en retour vers l'hôte primaire à l'approche de l'hiver (**figure IV.2**). Ce retour peut s'effectuer ou bien sous la forme d'un individu ailé sexupare, qui donnera naissance à des mâles et des femelles sur l'hôte primaire ; ou bien sous forme de mâles et de femelles produits sur l'hôte d'été, et qui migrent à l'approche de l'hiver pour se reproduire. L'accouplement donne lieu à la production d'œufs résistants au froid, qui sont la seule possibilité d'hiverner pour ces espèces dans les régions froides (Simon *et al.* 2002).

Ce type de cycle, bien qu'étant le plus étudié, puisqu'il englobe la plupart des pucerons que l'on trouve sur les plantes cultivées, ne concernerait que 10% du nombre total d'espèces de pucerons (Williams et Dixon 2007).

2.2 Cycle à un seul hôte : 'monoécie'

Le terme englobe l'ensemble des pucerons qui réalisent la totalité de leur cycle de vie sur la même plante hôte, ou sur des plantes hôtes appartenant à des genres proches. Il y a induction de la production de formes sexupares tout comme chez les espèces dioéciques, mais il n'y a pas de migration à l'approche de l'hiver et l'ensemble du cycle se produit généralement sur la même plante. Cette caractéristique est dans la plupart des cas issue d'une 'perte historique' à

partir de formes ancestrales dioéciques (Moran 1992). En l'absence d'alternance d'hôte, la capacité à produire des individus sexupares ailés devient sans intérêt, et chez plusieurs espèces de la tribu des *Aphidina*, les mâles sont aptères.

2.3 Absence de reproduction sexuée : anholocyclie.

En l'absence de stimuli entraînant la production d'individus sexupares, ou en l'absence d'une densité suffisante de l'hôte primaire, certaines lignées peuvent ne pas accomplir de cycle complet sous certaines latitudes (Rispe *et al.* 1998). La multiplication ne se fait que par apomixie, et les lignées sont donc uniquement clonales. Chez une petite partie des espèces connues (environ 3%), aucune forme sexupare n'a été décrite : ces espèces sont considérées comme anholocycliques sur l'ensemble de leur aire de répartition (Williams et Dixon 2007).

Dans ce cas, la période hivernale entraîne un déclin important de la population, voire la disparition totale de l'espèce sous certaines latitudes, qui sont donc recolonisées chaque année par de nouveaux migrants (Blackman 1974).

3. Anholocyclie et holocyclie : succès démographique vs succès évolutif

Les lignées et espèces asexuées sont souvent décrites comme se trouvant dans un 'cul de sac' évolutif (Delmotte *et al.* 2003), et sont considérées comme vouées à l'extinction à long terme (Lynch *et al.* 1993). La principale cause de ce déclin ('mutational meltdown') évolutif serait le coût de l'accumulation de mutations délétères, appelé 'Muller's ratchet' (cliquet de Muller) (Felsenstein 1974). Cependant, la situation n'est pas si simple, et si la survie à long terme de lignées clonales issues d'une espèce sexuée est vraisemblablement compromise (Gouyon 1999 ; Simon *et al.* 2002), certaines espèces, dont les plus emblématiques sont les bdelloïdes rotifères, semblent n'avoir jamais connu d'épisodes de recombinaison au cours de leur histoire évolutive (Birky 2004 ; Birky 2010), sans qu'ils ne semblent en subir de conséquences négatives (Welch *et al.* 2009).

A l'échelle des écosystèmes, le succès de la colonisation de milieux vierges par une espèce est généralement imputable à sa capacité à s'adapter aux contraintes environnementales d'un nouveau milieu sous l'effet de la sélection naturelle (Sakai *et al.* 2001 ; Lee 2002) ; cette adaptabilité évolutive est souvent décrite comme étant favorisée par une plus grande diversité génétique (Lavergne et Molofsky 2007), à laquelle contribue fortement la recombinaison chez les lignées sexuées (Gilchrist et Lee 2007) .

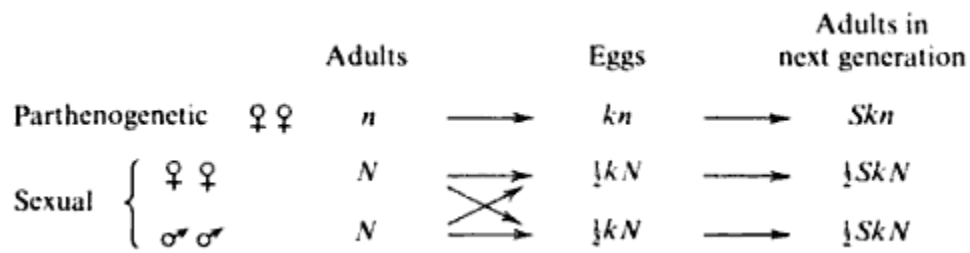


Figure IV.3 : Explication du ‘twofold cost of males’ : après une génération, le nombre de descendants d’une lignée parthénogénétique est deux fois supérieur à une lignée holocyclique, car deux individus sont nécessaires à la production de descendants (Maynard Smith 1978).

N est le nombre d’individus à la première génération, k le nombre d’œufs produits par une femelle, et S le taux de survie des œufs

Cependant, le succès de l'invasion ne tient pas seulement à la diversité du ravageur, certaines espèces y parvenant avec une faible diversité génotypique ; dans ce cas, c'est la plasticité phénotypique (Sexton *et al.* 2002 ; Geng *et al.* 2007), ou encore le nombre répété d'événements d'introduction (Kolbe *et al.* 2004 ; Roman et Darling 2007) qui en conditionnerait la réussite.

Malgré les contraintes adaptatives de l'absence de recombinaison, les lignées et espèces clonales bénéficient d'un considérable avantage démographique, du fait du 'double coût' (**Figure IV.3**) de production de mâles chez les lignées holocycliques (Maynard Smith 1978). Les pucerons, dont le cycle biologique comporte de longues phases d'anholocyclie, correspondent parfaitement à ce modèle (Lushai *et al.* 2003). Cet avantage est notamment important dans les régions à l'hiver peu rigoureux ; ainsi, l'incidence des modes de reproduction pourrait suivre un gradient de température, avec des régions entièrement anholocyclique, d'autres où la production de mâles est systématique, et des régions intermédiaires présentant les deux formes de cycle (Rispe et Pierre 1998). Dans le cas de populations invasives, les lignées asexuées présentent des avantages directs sur les lignées sexuées, non seulement sur le plan démographique, mais également à cause de la difficulté à trouver un partenaire pour l'accouplement, un hôte primaire satisfaisant (Wilson *et al.* 2003), du double coût de la production de mâles, et de la consanguinité relative au croisement de lignées génétiquement peu diverses (Frankham 2005 ; Peccoud *et al.* 2008).

4. Superclones : chronique d'un succès démographique

L'avantage démographique conféré par la reproduction clonale peut s'observer à une large échelle géographique : ainsi, au cours d'études de diversité menées sur de vastes échantillons, il est fréquent de retrouver des clones largement majoritaires au sein des populations, quelle que soit la diversité génotypique observée (Sunnucks *et al.* 1997 ; Fuller *et al.* 1999 ; Llewellyn *et al.* 2003). Il semblerait donc que la sélection inter-clonale favorise certains génotypes généralistes, parfois appelés « super-clones », capables de tolérer une vaste gamme de conditions écologiques (Vorburger *et al.* 2003). Ils sont l'illustration même du succès démographique des lignées clonales, et de leur adaptabilité à différentes conditions environnementales, malgré l'absence de recombinaison (Castañeda *et al.* 2010). En revanche, Simon *et al.* (2010) postulent que de par leur faible diversité génétique, ces lignées clonales sont sujettes à un 'turnover' fréquent, et peuvent être localement remplacées par d'autres

lignées clonales mieux adaptées (Vorburger *et al.* 2003). Dans le cas de la lutte génétique contre les ravageurs, cela signifie que les cultures pourraient être sujettes à des changements rapides de la composition des populations de ravageurs.

5. Biotypes et races d'hôte : menace latente

L'adaptation de certains génotypes de pucerons à une plante hôte, à un cultivar, ou à un fonds génétique résistant, a été démontrée sur plusieurs modèles (Caillaud *et al.* 1995 ; Bournoville *et al.* 2000). Une lignée génétiquement distincte et adaptée à une condition particulière est en général appelée « biotype » ; ce terme peut englober de nombreuses significations, et couvrir l'ensemble du continuum de diversification entre un simple polymorphisme et l'isolement en sympatrie conduisant à la spéciation (Drès et Mallet 2002).

La question de la diversité d'une espèce de ravageur revêt une importance dans une stratégie de maintien de la durabilité d'une résistance déployée : face à la variabilité des biotypes de pucerons, et leur capacité avérée à contourner les résistances (Dogimont *et al.* 2010), il est important de pouvoir caractériser la diversité présente dans chaque zone de culture, et, le cas échéant, de prendre les mesures prophylactiques nécessaires afin de limiter les risques d'introduction (Kindlmann *et al.* 2007). Plusieurs modèles de plantes cultivées doivent d'ailleurs faire face à des biotypes capables de contourner les résistances déployées. C'est le cas des gènes *Mi* chez la tomate, et *Vat* chez le melon, pour lesquels des biotypes contournants ont été décrits. Dans le cas de *Mi*, ce contournement se fait malgré le large spectre d'effets du gène qui confère la résistance à plusieurs espèces non apparentées de ravageurs (Rossi *et al.* 1998). Pour *Vat*, ces biotypes ont été observés alors même que la diversité globale des populations est très faible, soulignant un fort potentiel adaptatif en l'absence de reproduction sexuée (Lombaert *et al.* 2009).

L'adaptation à la plante hôte est le fait de lignées qui, si elles ne constituent pas encore des taxa distincts, présentent des performances et des traits biologiques distincts, dans leur cycle ou encore dans leur morphologie (Loxdale et Lushai 2007). Cette préférence d'hôte est notamment marquée chez les espèces dites polyphages, pour lesquelles la spécificité d'hôte structure les populations quelle que soit l'échelle géographique (Via 1984 ; Drès et Mallet 2002). La diversification adaptative liée à cette variabilité des performances peut par ailleurs conduire à un isolement reproducteur (Caillaud et Via 2000), et in fine à une spéciation en sympatrie des différentes races d'hôte (Schluter 2001 ; Drès et Mallet 2002) ; cela a

récemment été observé pour les races d'hôte du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* (Peccoud *et al.* 2009).

L'utilisation de marqueurs moléculaires, notamment microsatellites ou mitochondriaux, permet de caractériser ces populations et relier la diversité génotypique aux spécificités biologiques de chaque lignée (Sunnucks *et al.* 1997). Les outils modernes de génétique des population peuvent permettre d'évaluer la variabilité des biotypes (Burd *et al.* 2006), de mettre en évidence une structuration fine (Peccoud *et al.* 2008 ; Carletto *et al.* 2009) ou une introduction récente (Figueroa *et al.* 2005). Ces informations permettent ainsi de prendre, la mesure du risque lié à l'interaction entre la diversité observée des populations de pucerons, et les résistances déployées dans les plantes cultivées. En particulier, les plantes adventices proches peuvent constituer un réservoir de diversité génotypique pouvant être impliqué dans l'apparition de génotypes contournants dans une culture (Burd et Porter 2006).

V Association Mapping chez la canne à sucre

Parce qu'il n'existe pas de traitement curatif efficace, la sélection de cultivars résistants au virus ou à son vecteur constitue le principal moyen de lutte contre les maladies d'origine virale. Le processus de caractérisation de sources de résistance et leur utilisation en amélioration variétale étant fastidieux, particulièrement chez la canne à sucre, l'utilisation d'outils tels que la sélection assistée par marqueurs, permettrait d'améliorer l'efficacité de la sélection, notamment en améliorant l'efficacité du phénotypage, souvent long et fastidieux.

Chez la canne à sucre, l'absence d'identification de QTLs majeurs, ainsi que la complexité du génome, constituent les principaux obstacles à l'utilisation de la génomique pour l'amélioration variétale. En effet, la plupart des résistances décrites à ce jour aux maladies ou ravageurs impliquent typiquement un contrôle génétique par de nombreux QTL à effet individuel faible (Offmann 2000 ; Nibouche *et al.* 2010). Seuls trois gènes de résistance à des maladies ont été identifiés à ce jour chez la canne à sucre : deux conférant la résistance à la rouille brune (*Puccinia melanocephala*), et un conférant la résistance au Yellow Spot (*Mycovellosiella koepkei*) (Daugrois *et al.* 1996 ; Asnaghi *et al.* 2004 ; Raboin *et al.* 2006 ; Aljanabi *et al.* 2007).

A ce jour, la plupart des recherches de QTLs chez la canne à sucre ont été classiquement réalisées sur des descendance de croisements bi-parentaux, spécialement créées et testées pour un ou quelques traits d'intérêt. Récemment, des études d'association basées sur l'exploitation du déséquilibre de liaison (DL), ou Association Mapping, ont suscité un intérêt croissant en génétique végétale (Flint-Garcia *et al.* 2003 ; Gupta *et al.* 2005 ; Rafalski 2010). Le DL est l'association non aléatoire d'allèles à des loci distincts dans un échantillon donné de matériel végétal. Chez la canne à sucre, le déséquilibre de liaison est dû au faible nombre d'épisodes de recombinaison lors des croisements réalisés au cours des processus historiques de création variétale. A la différence des études basées sur une descendance bi-parentale, l'Association Mapping ne requiert pas la constitution de populations ségrégeantes de généalogie contrôlée, mais repose sur l'utilisation de collections de cultivars représentatifs de la diversité génétique exploitée en sélection.

1. Avantages et limites de l'Association Mapping

Les études d'association mapping sont basées sur des populations ou des collections de germplasm, ce qui apporte des avantages majeurs : (i) les individus composant de telles populations ou collections peuvent être génétiquement éloignés et peuvent avoir accumulé des événements de recombinaison sur de nombreuses générations, permettant ainsi une cartographie à haute résolution, (ii) ces individus peuvent être phénotypés pour un grand nombre de caractères d'intérêt, (iii) ces individus peuvent couvrir une large proportion des allèles d'intérêt agronomique présents dans le germplasm (Morgante et Salamini 2003 ; Rafalski et Morgante 2004).

Cependant, l'Association Mapping souffre de certaines limitations : cette approche présente notamment des probabilités d'erreur de type I (détection de fausses associations marqueur-trait) et de type II (non détection d'associations réelles) plus élevées que les études classiques biparentales de recherche de QTL (Brescaghi et Sorrells 2006). L'erreur de type I peut résulter de la présence d'une structuration génétique dans la population étudiée, qui doit être prise en compte lors de la détection de marqueurs liés à un trait phénotypique (Cardon et Bell 2001). Les erreurs de type II peuvent résulter (i) de la faiblesse des associations marqueur – trait, liée à l'extinction du DL avec la distance génétique, (ii) d'effets de confusion liés à la présence d'allèles à différentes fréquences, (iii) de la nécessité d'utiliser des seuils de signification à des niveaux très faibles pour contrôler l'erreur de type I *genome wise* résultant de l'utilisation de nombreux marqueurs pour couvrir le génome (Carlson *et al.* 2004).

2. Faisabilité de l'Association Mapping chez la canne à sucre

L'étendue du DL conditionne la possibilité d'utiliser des approches de *genome scan* ou d'association sur gènes candidats (Nordborg et Tavaré 2002 ; Flint-Garcia *et al.* 2003).

La possibilité d'appliquer cette approche DL à la canne à sucre a été soulignée par plusieurs auteurs (Jannoo *et al.* 1999 ; Raboin *et al.* 2008). L'étendue du DL chez la canne résulte du caractère récent de l'amélioration variétale de cette culture. Seules quelques générations séparent les cultivars modernes d'un nombre limité de clones fondateurs, limitant ainsi le nombre de méioses et par conséquent la possibilité de recombinaisons chromosomiques. Les travaux de Raboin *et al.* (2008) ont permis d'évaluer l'étendue du DL chez la canne à sucre. Cette étude a exploité les cartes génétiques disponibles pour déterminer un seuil statistique

empirique permettant de distinguer les associations entre marqueurs réellement dues au DL de celles qui sont des artefacts. Des associations ont été détectées entre des marqueurs AFLP séparés de 40 cM. Bien qu'étendu, le DL chute cependant rapidement au-delà de 5 cM.

Peu d'études ont appliqué l'Association Mapping à la canne à sucre. Raboin (2005) a étudié la relation entre 1537 marqueurs AFLP et la résistance au charbon sur un échantillon de 72 cultivars. Wei et al. (2006) ont utilisé 1537 marqueurs AFLP et 141 SSR pour détecter des associations avec la résistance à quatre maladies au sein d'une population de 154 cultivars. Butterfield (2007) a recherché des associations entre 275 marqueurs RFLP et 1056 AFLP à la résistance au charbon et au lépidoptère foreur de tige *Eldana saccharina* au sein d'une population de 77 génotypes. Plus récemment, Wei et al. (2010) se sont intéressés à la recherche de marqueurs associés aux composantes du rendement par association mapping au sein d'une population de 480 génotypes. Ces études ont confirmé le potentiel de l'Association Mapping chez la canne à sucre. Cependant, l'obtention d'un marquage permettant la couverture du génome reste un défi chez cette plante.

3. Marqueurs moléculaires et couverture du génome de la canne à sucre

A ce jour, même les meilleures cartes génétiques de la canne à sucre restent partiellement couvertes en raison (i) du manque de marqueurs disponibles, (ii) de la faible couverture de la partie très redondante du génome issue de *S. officinarum* (Grivet *et al.* 1996 ; Hoarau *et al.* 2001 ; Rossi *et al.* 2003 ; Aitken *et al.* 2005 ; Raboin *et al.* 2006), et (iii) de la difficulté à utiliser des marqueurs multi-doses (Wu *et al.* 1992) qui nécessitent de réaliser des cartes consensus (da Silva *et al.* 1995 ; Aitken *et al.* 2005). Le nombre minimum de marqueurs multi-alléliques locus-spécifiques nécessaires pour atteindre une densité d'un marqueur tous les 5 cM se situerait entre 300 et 600 (la taille du génome haploïde de la canne à sucre est de l'ordre de 1500 cM), ce qui correspondrait à 3000-6000 marqueurs pour couvrir la totalité du génome.

Plusieurs technologies de génotypage ont été utilisées pour générer des marqueurs chez la canne à sucre. Les premiers marqueurs développés reposaient sur la technologie RFLP, et ont été largement utilisés pour la cartographie. Ils présentent cependant l'inconvénient d'être à très bas débit, c'est-à-dire que la production de marqueurs et le génotypage de cultivars sont longs et coûteux. D'autres marqueurs ont remplacé les RFLP en cartographie, notamment les SSR (Single Sequence Repeat, ou microsatellites), qui sont des marqueurs locus-spécifique à

bas débit, et AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), qui sont non locus-spécifiques, mais à moyen débit, ce qui permet de mieux couvrir le génome. Ces trois types de marqueurs constituent notamment les cartes des cultivars R 570 (Hoarau *et al.* 2001 ; Raboin *et al.* 2006) et MQ 76/53 (Raboin *et al.* 2006). La technologie DArT (Diversity Array Technology) basée sur des techniques d'hybridation sur puce à ADN, permet de détecter du polymorphisme sur plusieurs milliers de loci simultanément (Wenzl *et al.* 2004). Cette technologie a été utilisée avec succès pour générer un grand nombre de marqueurs chez le riz (Jaccoud *et al.* 2001), l'orge (Wenzl *et al.* 2004), le manioc (Xia *et al.* 2005) ou la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Wittenberg *et al.* 2005). Chez la canne à sucre, des marqueurs DArTs ont été récemment développés (Heller-Uszynska *et al.* In press) et utilisés par Wei *et al.* (2010) dans le cadre d'une étude d'Association Mapping. L'intérêt de ces marqueurs est notamment leur codage automatisé qui permet réellement d'accéder à un génotypage à haut débit chez la canne à sucre, et devrait remplacer avantageusement les AFLP dans un futur proche.

D'autres technologies à haut débit basées sur les SNPs pourraient être utilisées grâce aux importantes ressources en EST disponibles chez la canne à sucre. Les SNPs pourraient présenter un intérêt pour cartographier des gènes candidats ou identifier les bases génétiques de QTLs connus (Grivet *et al.* 2003 ; Cordeiro *et al.* 2006 ; McIntyre *et al.* 2006). Cependant, l'identification de SNPs utilisables chez la canne est difficile (Grivet *et al.* 2003). Les SNPs n'ont pour l'instant pas été utilisés dans des études d'association mapping genome wide : leur utilisation reste coûteuse et nécessite une mise au point complexe du fait de la polyploïdie de la canne. Les AFLP et les microsatellites ont été utilisés avec succès dans des études d'association mapping chez la canne (Wei *et al.* 2006 ; Butterfield 2007 ; Raboin *et al.* 2008). Le nombre de SSR disponibles chez la canne à sucre s'accroît progressivement (Rossi *et al.* 2003 ; Pinto *et al.* 2004).

VI Objectifs de la thèse

La résistance variétale est un élément incontournable de la lutte contre les ravageurs des cultures à travers le monde. C'est encore plus vrai dans le cadre de maladies d'origine virale, pour lesquelles aucun traitement curatif n'est disponible, et où la sélection de cultivars résistants constitue le seul moyen pour contrôler les populations virales. Si les sources de résistance aux maladies virales ont été largement étudiées, elles sont généralement dirigées contre le virus lui-même, affectant notamment sa capacité à se répliquer ; en revanche, peu d'études se focalisent sur l'importance épidémiologique de la résistance au vecteur contre la propagation de la maladie.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet plus vaste portant sur la génétique d'association de marqueurs moléculaires à des traits phénotypiques d'importance agronomique chez la canne à sucre, notamment les facteurs de résistance aux maladies. Parmi elles, la maladie de la feuille jaune est une virose d'importance économique, identifiée depuis moins de 20 ans et à laquelle les schémas de sélection ne se sont intéressés que très récemment. Les travaux menés au cours de cette thèse s'appuient sur la caractérisation phénotypique de deux collections de cultivars représentatifs de la diversité utilisée en culture et en sélection à travers le monde.

Ce travail de thèse est consacré à l'étude de la diversité et de la spécificité des résistances au *Sugarcane yellow leaf virus* et à son vecteur *Melanaphis sacchari*, et a été partagé en trois questions de recherche :

- Quelle est la diversité des sources de résistance à la maladie de la feuille jaune au sein du germplasm de la canne à sucre ? Quels sont les marqueurs génétiques liés à l'incidence de la maladie et de son vecteur ?
- Quels sont les mécanismes de résistance à l'échelle de la plante qui affectent les performances de *Melanaphis sacchari* sur le cultivar résistant R 365 ?
- Quels éléments structurent la diversité génétique des populations de *Melanaphis sacchari* à l'échelle mondiale et à l'échelle de la Réunion ?

CHAPITRE I : Génétique
d'association pour la
résistance à la maladie de la
feuille jaune



Essai variétal à la station 'Oost-Java', variété POJ 213

(Crédit: *Mededeelingen van het profestation voor de Java-Suikerindustrie (1921)*)

Chapitre 1 : Génétique d'association pour la résistance à la maladie de la feuille jaune

La maladie de la feuille jaune (Yellow Leaf Disease) est une maladie virale affectant la canne à sucre, causée par un Polérovirus - le SCYLV (*Sugarcane yellow leaf virus*) – et transmise par plusieurs espèces de pucerons. La lutte génétique basée sur l'utilisation de cultivars résistants, à la fois au virus et à son vecteur, est la méthode de contrôle préférentielle pour les maladies d'origine virale. Au cours de ce travail, nous avons conduit une étude de génétique d'association (association mapping) basée sur une collection de 344 cultivars de canne à sucre. Ces cultivars ont été séparés en deux panels, l'un à la Réunion comprenant 184 cultivars, l'autre en Guadeloupe comprenant 189 cultivars. Parmi les cultivars utilisés, 29 étaient communs aux deux panels. Les deux panels ont été phénotypées au champ en conditions d'infestation naturelle pour l'incidence du SCYLV, et l'incidence de *M. sacchari* a été évaluée à la Réunion. Un travail de génotypage a été conduit sur les deux panels à l'aide de marqueurs AFLP (1408 pour le panel Réunion, 2402 pour le panel Guadeloupe) et DArTs (1899 pour Réunion, 1550 pour Guadeloupe), ainsi que 30 marqueurs SSR pour le panel Réunion. La structure génétique des panels a été évaluée par une analyse en composantes principales (ACP), en utilisant 1096 marqueurs DArTs indépendants pour le panel Réunion, et 867 pour le panel Guadeloupe.

L'effet cultivar est significatif dans les deux panels pour l'incidence du SCYLV, et suit globalement une distribution bimodale : la plupart des cultivars sont infestés à 100%, certains sont toujours indemnes, et une petite partie présente un profil d'infestation intermédiaire. Cet effet est plus prononcé à la Réunion, le panel Guadeloupe présentant de plus forts niveaux d'infestations pour le virus. L'incidence de *M. sacchari* suit une distribution normale, et l'effet cultivar est significatif

Les associations marqueurs-traites ont été réalisées avec le logiciel TASSEL, en utilisant un modèle linéaire mixte, tenant compte de la structure des panels, et d'une matrice d'apparentement (kinship) entre cultivars.

- Pour l'incidence du SCYLV, 21 marqueurs étaient significativement associés dans le panel Réunion, définissant 12 haplotypes indépendants, et 19 haplotypes (32 marqueurs) dans le panel Guadeloupe. Parmi les haplotypes détectés, 17 haplotypes sont communs aux deux panels ; 5 ont été 'validés', c'est à dire significativement

associés à l'incidence au champ du SCYLV dans les deux panels : l'un détecté au seuil d'erreur genome-wide dans les deux panels, et quatre autres détectés dans un des panels, et associés au seuil de 5% dans le second panel.

- L'analyse marqueur-trait pour l'incidence du vecteur *M. sacchari* dans le panel Réunion a permis de détecter 25 marqueurs significatifs, répartis en 18 haplotypes indépendants. Parmi ces haplotypes, trois sont significativement liés à l'incidence du SCYLV dans l'un des deux panels, dont deux ont été validés dans les deux panels.
- Nous avons observé un lien entre l'incidence du virus et celle de son vecteur à la Réunion. Une corrélation phénotypique significative a été observée entre les deux incidences, et trois haplotypes significativement associés à l'incidence du virus à la Réunion ou en Guadeloupe sont associés à l'incidence du vecteur à la Réunion, avec un effet (R ou S) similaire pour les deux traits.

La détection de marqueurs liés à l'incidence de la maladie, dans deux contextes agronomiques distincts, ainsi qu'à celle de son vecteur, offre des perspectives intéressantes pour les schémas de sélection. Après avoir été validés dans des croisements biparentaux et sur des populations élites, ces marqueurs pourront être utilisés pour trier des accessions porteuses des facteurs de résistance identifiés dans cette étude, afin d'améliorer l'efficacité du phénotypage.

Publication associée :

B. Fartek, S. Rocher, S. Debibakas, C. Hervouet, S. Royaert, D. Roques, A. Thong Chane, J.-H. Daugrois, A. D'Hont, J.-Y. Hoarau, S. Nibouche and L. Costet

Association mapping of sugarcane resistance to Sugarcane Yellow Leaf Disease.

Soumission envisagée dans la revue Theoretical and applied Genetics

Association mapping of sugarcane resistance to Sugarcane Yellow Leaf

Disease.

B. Fartek^{1,4}, S. Rocher^{2,3}, S. Debibakas^{6,7}, C. Hervouet², S. Royaert¹, D. Roques³, A. Thong Chane⁵, J.-H. Daugrois⁶, A. D'Hont², J.-Y. Hoarau³, S. Nibouche¹ and L. Costet¹

¹Cirad, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France; ²Cirad, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France; ³Cirad, UMR AGAP, F-97170 Petit Bourg, Guadeloupe, France; ⁴Université de la Réunion, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France, ⁵eRcane, F-97494 Sainte-Clotilde, La Réunion, France; ⁶Cirad, UMR BGPI, F-97170 Petit Bourg, Guadeloupe, France; ⁷Université des Antilles et de la Guyane, F-97157 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France.

Corresponding author: Laurent Costet, Cirad, UMR PVBMT, Pôle de Protection des Plantes, 7 chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, île de la Réunion, France. E-mail: laurent.costet@cirad.fr

Keywords: Association mapping, *Polerovirus*, *Melanaphis sacchari*, resistance, *Saccharum* sp.

Abstract

Sugarcane Yellow Leaf is a major viral disease of sugarcane, caused by a polerovirus - the *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) - transmitted by several aphid species. Varietal resistance, both against the virus and its vectors, is the most practicable control method of this disease. In order to analyze the genetic basis of the resistance to SCYLV and to its worldwide aphid vector *Melanaphis sacchari*, we undertook an association mapping study based on 338 sugarcane cultivars. These 338 cultivars were separated in two panels, one in Reunion and one in Guadeloupe. Both panels were evaluated in field trials under natural infestation conditions for SCYLV incidence. The Reunion panel was also evaluated for *M. sacchari* infestation. Both panels were genotyped with AFLP markers (1,408 markers for the Reunion panel and 2,402 markers for the Guadeloupe panel) and DArT markers (1,899 markers for the Reunion panel and 1,550 markers for the Guadeloupe panel) and 30 SSR markers for the Reunion panel. Genetic structure of both panels was analyzed by a Principal Component Analysis (PCA), using respectively 1096 and 867 independent DArT markers for the Reunion and Guadeloupe panels. Significant marker – trait associations were detected with the TASSEL software, using a mixed linear model taking into account structure and family relatedness. Analysis of marker-trait associations for resistance to SCYLV, with genome wise type-I error control by permutations, revealed 21 markers, defining 12 independent haplotypes in Reunion, and 32 markers in 19 independent haplotypes in Guadeloupe. Among the markers that were significant either in Reunion or in Guadeloupe, 28 (17 independent haplotypes) were coded in both panels. Among these 17 common haplotypes, five were confirmed, i.e. detected in one panel with GW type-I error control and significant at a nominal P value < 0.05 in the second panel. Analysis of marker-trait associations for resistance to aphids detected 25 significant markers, defining 18 independent haplotypes. Three of these haplotypes were significantly associated with reduction of SCYLV incidence in Reunion or in Guadeloupe.

Introduction

The yellow leaf disease of sugarcane has a major economic importance in Reunion, in Guadeloupe and in most of sugarcane producing areas in the world (Rott et al. 2008). It is caused by the *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV), a persistent circulative nonpropagative polerovirus vectored by aphids (D'Arcy and Domier 2005; Vega et al. 1997). In Reunion, the virus is mainly transmitted by the aphid *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Rassaby et al. 2004). This disease has been described recently (Schenck 1990, 1997) and can cause important yield losses in susceptible cultivars, even when infected plants do not exhibit disease symptoms. In Reunion, the sugarcane yellow leaf disease is responsible for heavy yield losses in susceptible cultivars (Rassaby et al. 2003) and the improvement of resistance to this disease would be of great economic interest. Six genotypes of the SCYLV have been described and identified as BRA, PER, REU, CUB, IND and CHN (Abu Ahmad et al. 2007; Abu Ahmad et al. 2006a; Viswanathan et al. 2008; Wang and Zhou 2010). BRA-PER (the available primer set cannot distinguish the two genotypes), REU and CUB genotypes are present in Guadeloupe, while BRA-PER and REU are present in Reunion (Abu Ahmad et al. 2007; Abu Ahmad et al. 2006a). Indexation of germplasm collections of sugarcane and related species for the presence of the virus revealed potential source of resistance to the yellow leaf disease. Commercial cultivars (*Saccharum* spp.), *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. sinense* presented high virus incidence, whereas virus incidence was low for *S. barberi*, *S. spontaneum*, *Miscanthus* and *Erianthus* (Comstock et al. 2001; Komor 2010; Schenck and Lehrer 2000). Resistance to *M. sacchari* was recently explored among five commercial cultivars (Akbar et al. 2010). Varietal resistance improvement is the most efficient strategy, but lack of knowledge of the genetic basis of yellow leaf resistance in sugarcane makes breeding progress for this disease difficult.

Linkage disequilibrium (LD)-based studies, or Association Mapping studies, are based on existing panels or germplasm collections, which may imply major advantages (Brescaghello and Sorrells 2006; Pritchard et al. 2000; Zhu et al. 2008): (1) individuals in such collections may be more distantly related and may have accumulated recombination events over many generations allowing high resolution mapping, (2) individuals in such collections may be well characterized for a range of interesting traits, (3) individuals in such collections may encompass a significant proportion of alleles of agronomic value (Morgante and Salamini 2003; Rafalski and Morgante 2004). But association mapping studies suffer of some limitations. Association Mapping has higher probabilities of type I and type II error than classic biparental QTL analysis (Brescaghello and Sorrells 2006). Type I error, or detection of false marker trait associations, may be the result of genetic structure within the panel studied. Type II error, or lack of detection of actual associations, results at least from (i) lower association between markers and genes due to the decay of LD, (ii) unbalanced design resulting from the presence of alleles at different frequencies, (iii) very strict genome-wise significance thresholds resulting from relative independence between tested markers (Carlson et al. 2004). The extent of LD determines whether genome scans or candidate gene association approaches can be used (Flint-Garcia et al. 2003; Nordborg and Tavaré 2002). The possibility to apply this LD approach to sugarcane has been highlighted early (Jannoo et al. 1999). The extent of LD in sugarcane is the consequence of the recent breeding history of this crop. Only few generations separate modern cultivars from a limited number of founder sugarcane clones, limiting the number of meiosis and consequently the opportunity of chromosome recombination. A recent study (Raboin et al. 2008; Raboin 2005) undertook an assessment of LD in sugarcane. Instances of significant LD have been detected between AFLP markers separated by up to 40 cM apart. Although generally extensive, LD drops sharply when markers are 5 cM or more apart. Many instances of linked markers cannot be

recognized, largely due to the confounding effect of polyploidy. However, LD within a sample of cultivars appears as efficient as linkage analysis within a controlled progeny in terms of assigning markers to cosegregation groups.

Several studies have applied association mapping to sugarcane. Raboin (2005) studied the association between 1537 AFLP markers and the resistance to smut on a 72 cultivar sample. Wei et al. (2006) used 1068 AFLP and 141 SSR markers to detect associations with resistance to four diseases in a collection of 154 cultivars. Wei et al. (2010) studied the association between DArT markers and cane yield and sugar content traits on a sample of 480 genotypes. These studies confirmed feasibility and the potential of genome wide association mapping in the polyploidy context of sugarcane.

The objective of this study was to use a LD-based association mapping approach on two interspecific (*S.officinarum* x *S. spontaneum*) sugarcane cultivar panels in order to identify markers associated with incidence of SCYLV and incidence of the aphid vector *Melanaphis sacchari*, two traits associated to the resistance to the yellow leaf disease

Material and methods

Plant material

Two panels of 200 sugarcane cultivars each were initially selected for this study. Molecular fingerprint (see genotyping section) allowed the identification of a few duplicate or mislabeled cultivars and permitted to check the identity of some cultivars. Finally, the two panels consisted in a total of 344 different sugarcane cultivars originating from 43 different breeding stations around the world. The first panel evaluated in Reunion, consisted of 184 cultivars. The second one evaluated in Guadeloupe, consisted of 189 cultivars, from which 29 were common with the Reunion panel. Details about these two cultivar panels are given in Sup. Tab. 1.

121

122 *Field trials*

123 In Reunion, sugarcane cultivars were compared in an alpha-lattice design planted (at Cirad
124 Saint-Pierre Station) in 2006 with three replications, 20 blocs per replication and 10 cultivars
125 per bloc. Elementary plots consisted in one 2.5 meter long row. Plots were 1.5m spaced. To
126 reduce interaction between adjacent plots and maximise aphids infestation and virus infection,
127 each elementary plot was separated from the neighbouring plot by a plot planted with the
128 cultivar B 34/104 (highly susceptible to aphids and SCYLV).

129 In Guadeloupe, cultivars were compared in two trials (T1 and T2) in randomized complete
130 block designs with three replications, planted respectively in 2005 and 2007 (at Cirad Roujol
131 Station). Elementary plot design was similar as in Reunion.

132

133 *SCYLV incidence assessment*

134 SCYLV detection was performed on the first fully emerged leaf by tissue-blot immunoassay
135 (TBIA) as described by Schenck et al. (1997). A stereo-microscope (x100) was used to
136 examine each midrib print on the TBIA membranes. A stalk was considered infected by
137 SCYLV when at least one vascular bundle showed a positive reaction. For the Reunion panel,
138 ten leaves from ten different stalks were randomly sampled in each elementary plot for
139 SCYLV detection in second ratoon crop cycle in 2009. For the Guadeloupe panel, ten to 15
140 leaves from different stalks distributed in the plot were randomly sampled for SCYLV
141 detection in second ratoon crop cycle. Sampling was realised in 2007 for T1 and 2010 T2.

142 An estimation of the prevalence of cultivars infected by each of the three viral genotypes
143 present in Guadeloupe and Reunion was performed in each panel as follows. Viral genotypes
144 were identified by RT-PCR with specific primers using methods described by Abu Ahmad et
145 al. (2006b). In Reunion, for each of the 163 cultivars scored as infected by TBIA, one of the

infected leaves was randomly chosen and tested by RT-PCR. In Guadeloupe, 10 leaves per elementary plot for each replication of 50 cultivars including 23 of the common between panel genotypes, were bulked prior to extraction and RT-PCR analysis.

Aphid incidence recording

Aphid infestation was evaluated in the Reunion trial. Aphid incidence was scored every two weeks during 14 weeks for the 2007-2008 cropping season, 20 weeks for the 2008-2009 cropping season, and 24 weeks for the 2009-2010 cropping season, for a total of 29 counts. At each observation date, in each elementary plot, the lowest green leaf of 20 randomly selected stalks was observed. A leaf was recorded as infested when at least one aphid was observed on it, and the percentage of infested leaves per plot was computed.

Genotyping

AFLP analysis was performed using the AFLP® Analysis System I (Invitrogen) as recommended by the manufacturer with slight modifications. 36 and 59 primer pair combinations were used respectively for the Reunion and Guadeloupe panel. In Guadeloupe AFLP analysis was performed as described in Hoarau et al. (2001). Radioactive labeling was used for the Guadeloupe panel and the AFLP fingerprints were scored visually on autoradiogram. Fluorescent labeling was used for the Reunion panel. EcoRI primers were labeled with fluorophores, while *MseI* primers were unlabelled. Five µL of diluted pre-amplified DNA was mixed with 1xPCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.24 µM *MseI*+3 primer, 0.12µM EcoRI+3 primer, 1.25 U RedGoldStar™ DNA polymerase (Eurogentec) and water was added to a final volume of 15 µL. PCRs were performed on a Perkin Elmer 9700 thermocycler using the following profile: one step of 94°C for 5 min followed by 13 cycles of 94°C for 30 s, 65°C for 30 s with a touchdown of 0.7°C per cycle,

and 72°C for 2 min. Afterwards 24 cycles were performed at 94°C for 30 s, 56°C for 30 s and 72°C for 2 min, followed by a final elongation step at 72°C during 10 min. To multi-mix the fluorophores, 1 µL of each fluorophore-labelled PCR product was mixed with 0.3 µL of the GeneScan™-500 LIZ™ size standard (Applied Biosystems) and 10.7 µL of Hi-Di™ formamide (Applied Biosystems), denaturated for 5 min at 95°C and cooled immediately on ice for at least 5 min. Electrophoresis was performed in a 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using performance-optimized polymer POP-7 at 15,000 V for about 20 min at 60°C, with an injection time of 23 s for one fluorophore reaction, and 46 s or 69 s for a multi-mix of two or three fluorophore reactions, respectively. The AFLP fingerprints were analyzed visually using GelCompar II software (Applied Maths BVBA). For SSR analysis, two of primer pair were used corresponding to the mSSCIR4 and mSSCIR164 loci (Raboin et al. 2006), about 50 ng of DNA was mixed with 1xPCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.2 µM forward of fluorescent labelled primer, 0.2 µM reverse primer, 0.5 U RedGoldStar™ DNA polymerase (Eurogentec) in a final volume of 25 µl. PCRs were performed with one step of 94°C for 5 min followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 1 min and finally one elongation step at 72°C for 5 min. Electrophoresis was performed as described for AFLP

Whole genome profiling was enriched with DArT markers (Heller-Uszynska et al. In press). DNA were sent for genotyping to the commercial company Diversity Arrays Technology Pty Ltd (Yarralumla, Australia).

A total of 3337 (1408 AFLP, 1899 DArT and 30 SSR) and 3952 (2402 AFLP and 1550 DArT) markers with a frequency ranging between 0.05 and 0.95 were produced respectively in the Reunion and Guadeloupe panel.

Statistical analysis

Panel genetic structure

Genetic structure of each panel was inferred from DArT markers with a Principal Component Analysis (PCA) approach (Patterson et al. 2006), using the SAS PRINCOMP procedure (SAS Institute 2008). Result from PCA may be distorted if uncorrected LD exists between markers (Patterson et al. 2006). To identify markers that were in LD, we applied the suggestion of Patterson et al. (2006) and removed a marker from every pair of markers that were in tight LD. Markers were considered in tight LD when they were significantly associated according to a Fisher test, using the Bonferroni correction for multiple testing. This resulted in the selection of 1096 markers in the Reunion panel and 867 markers in the Guadeloupe panel. The marker matrix was normalized (mean centering and standard deviance scaling) prior to perform PCA. Missing data were replaced by zero value after the normalization step. Four cultivars from the Reunion panel, and two from the Guadeloupe were identified as outliers in the PCA analysis, i.e. their coordinates in at least one of the ten first PCA axes were at least five fold larger than the within axe standard deviation. These cultivars were therefore removed from the analysis and are indicated with a star (*) in Sup. Tab. 1.

Estimation of genotypic value of cultivars

Aphid weekly infestation data from the Reunion trial were summarized by the area under incidence progression curve (AUIPC), computed for each cropping season separately. AUIPC were analyzed with a mixed model where cultivar, cultivar x cropping season and bloc were random effects, while replication and cropping season were fixed effects. To achieve normal distribution of residuals, AUIPC was submitted to a square root transformation prior to analysis. Analysis was performed with SAS procedure Mixed (SAS Institute 2008). We tested two possible improvements of the mixed model used to analyze AUIPC data: (i) taking into account the correlation of residuals across years due to observations carried out on the same

elementary plots (longitudinal data), and (ii) taking into account the spatial correlation among residuals due to aggregative spatial distribution of aphid populations in the field, using Littel et al. (2006) methods. None of these two modifications proved to be significant, according to a chi-squared test performed on the likelihood ratio statistic (Littel et al. 2006). The initial mixed model was therefore used to analyze AUIPC data.

The proportion of stalks infected by SCYLV was analyzed with a generalized mixed model (Logit link function, binomial distribution) using SAS procedure Glimmix and following guidelines from Bolker et al. (2008). In Guadeloupe, the model was designed to take location and replication into account as fixed effects, plus cultivar and cultivar x location as random effects. In Reunion, replication was a fixed effect, while cultivar and bloc were random effects.

The solution of the random cultivar effect of each model was estimated and these values were further used to perform marker trait association analysis.

The genotypic and environmental correlation coefficients between SCYLV and aphid incidence were computed following Gallais (1990) by performing a multivariate analysis of variance with the SAS Glm procedure, using variable transformations (square root for AUIPC and $\arcsin(\sqrt{\cdot})$ for SCYLV incidence) to achieve normal distribution of residuals.

Marker trait associations

Detections of marker trait associations were carried out with Yu et al. (2006) mixed model approach. Analyses were performed with the TASSEL 2.1. software (Bradbury et al. 2007) with the GLM model (coordinates along PCA axes used as fixed effect covariables) and with the MLM model (same as GLM plus a random polygenic effect added through a variance-covariance matrix derived from a kinship matrix).

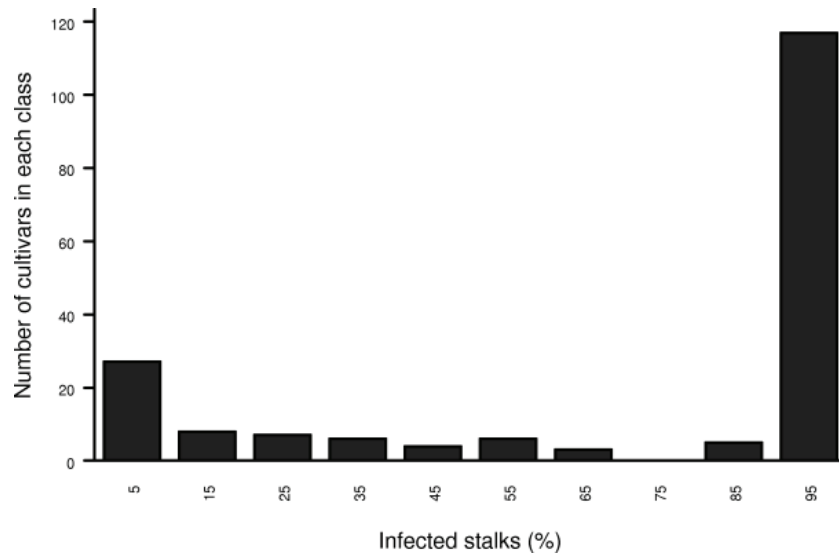


Figure 1: Frequency distribution of mean percentage of stalks infected by SCYLV among 184 cultivars in Reunion (individual phenotypic means over three replications).

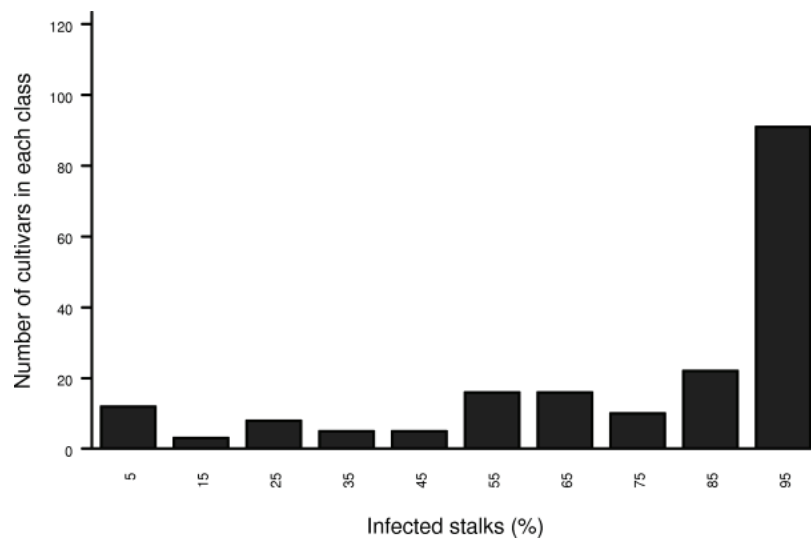


Figure 2: Frequency distribution of mean percentage of stalks infected by SCYLV among 189 cultivars in Guadeloupe (individual phenotypic means over two trials, three replications each).

The number of PCA axes included in the models was determined following the two stage procedure described by Zhu et Yu (2009). In stage 1, the number of significant principal components was assessed by the Tracy-Widom test as detailed by Patterson et al. (2006). In stage 2, using a linear model, we fitted each phenotypic trait values with an increasing number of PCA axes coordinate covariates, up to the number of significant dimensions identified in the first stage. The number of dimensions with the lower Bayesian Information Criteria (BIC) value was chosen.

Markers associated to a trait at a nominal p value inferior to 0.05 were grouped in haplotypes, by using the results from pairwise association Fisher tests with Bonferroni correction, according to the procedure described by Raboin et al. (2008).

Final marker-trait associations were considered using (i) nominal (marker wise) p value, (ii) p value at a genome wise (GW) type-1 error rate (based on permutation tests). Marker detected at the 0.05 GW type-I error level in a panel and detected at the nominal 0.05 type-I error level in the other panel were considered as confirmed linkage according to the criterion of Lander and Kruglyak (1995) for comparison across panels.

Results

SCYLV and aphid incidence

The cultivar mean SCYLV incidence exhibited a U-shape distribution, more pronounced in Reunion than in Guadeloupe (Fig. 1 and Fig. 2). 19 cultivars remained free of SCYLV infection in Reunion and one cultivar was free of SCYLV in Guadeloupe. MQ 76/53 was the sole cultivar free of SCYLV both in Reunion and Guadeloupe. Comparison of virus incidence between Reunion and Guadeloupe on the 29 common cultivars with SAS proc Genmod revealed no significant site x incidence interaction ($F < 0.01$; $df = 1, 84$; $P = 0.9809$).

Table 2: Estimation of prevalence of viral genotypes in each panel: frequency of cultivar infected by each viral genotype in the Reunion and Guadeloupe cultivar panels

Viral genotype ⁽¹⁾	Guadeloupe panel ⁽²⁾	Reunion panel ⁽²⁾
REU	0.72	0.96
BRA-PER	0.62	0.08
CUB	0.98	0

- (1) Viral genotype detected in cultivars
 (2) Frequency of cultivars where the corresponding genotype was detected

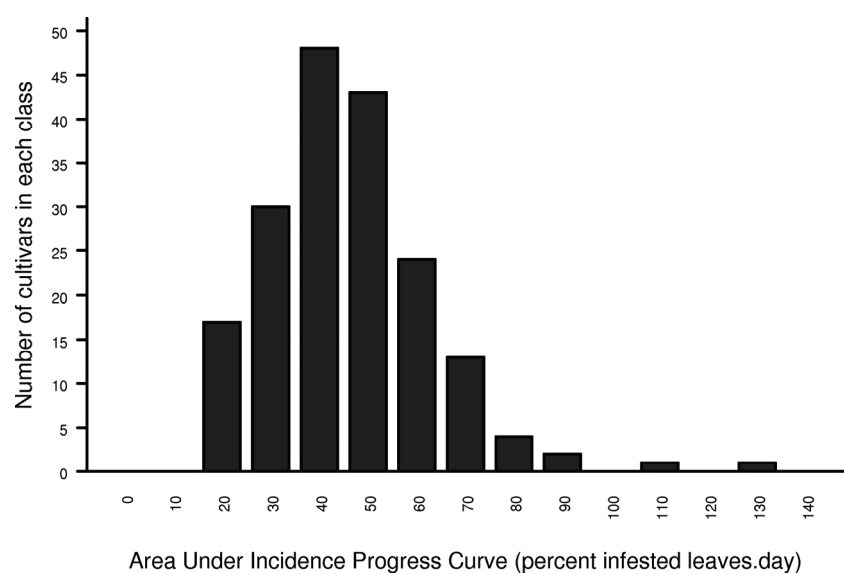


Figure 3: Frequency distribution of aphid incidence among 184 cultivars in Reunion (individual phenotypic mean over three replications, during three years and 29 observations).

The two viral genotypes BRA-PER and REU were detected in both cultivar panels and CUB was detected only in Guadeloupe (Tab. 2). Prevalence of viral genotypes varied greatly between the two panels. In Reunion, the REU viral genotype was found in 96 % of the infected cultivars and the BRA-PER genotype only in 8%. In Guadeloupe CUB, REU, and BRA-PER genotypes were found respectively in 98%, 72% and 62% of the infected cultivars. The distribution of aphid incidence means among the 184 cultivars exhibited a bell distribution with a slight right dissymmetry due to few highly susceptible cultivars (Fig. 3). Nineteen resistant cultivars exhibited an aphid incidence mean significantly ($P < 0.05$) lower than the trial mean (Sup. Tab. 1), 13 susceptible cultivars exhibited an aphid incidence mean significantly ($P < 0.05$) higher than the trial mean, the remaining 151 intermediate cultivars exhibited an aphid incidence mean not significantly different from the trial mean ($P > 0.05$). Phenotypic correlation between SCYLV incidence and AUIPC was positive and significant ($r = 0.108$; $P = 0.0093$). Corresponding genotypic correlation coefficient between both traits was low (0.162), while the environmental correlation was close to zero (0.010). Comparison of the virus incidence between the three aphid susceptibility classes, using SAS proc Glimmix, revealed a highly significant class effect ($F = 83.03$; $df = 2, 196$; $P < 0.0001$). Aphid resistant cultivar class had lower mean (\pm SE) virus incidence (47.4 ± 2.1 %) than the susceptible (71.8 ± 2.1 %) and the intermediate (74.1 ± 0.6 %) classes. Virus incidence in susceptible and intermediate classes were similar.

Panel structure

In Reunion, the analysis of panel structure with PCA yielded 24 axes that were significant ($P < 0.05$) by the Tracy-Widom test. In Guadeloupe, the number of significant PCA axes was 15.

Table 1. List of significant haplotypes associated with resistance to SCYLV in the Reunion and the Guadeloupe panels and *M. sacchari* in the Reunion panel, using correction for panel structure (GLM model).

haplotype		virus incidence							aphids incidence		
		GLM							GLM		
		Reunion		Guadeloupe		confirmation nominal p value ^c	Freq ^b	Effect ^d	Reunion		
		GW P value ^a	Freq ^b	GW P value ^a	Freq ^b				GW P value ^a	Freq ^b	Effect ^d
R19	G11	***	0.17	*	0.09	-		R	NS	-	-
R13	G66	***	0.86	NS	-	**	0.86	S	***	0.45	S
R60	G48	NS	-	***	0.64	*	0.67	R	NS	-	-
R42	G34	NS	-	***	0.14	*	0.24	R	NS	-	-
R36	G25	*	0.12	NS	-	*	0.13	R	*	0.12	R
R79	G19	***	0.18	NS	-	NS	-	R	NS	-	-
R16	G1	**	0.53	NS	-	NS	-	S	*	0.38	S
R172	-	***	0.58	-	-	-	-	R	NS	-	-
R133	-	*	0.11	-	-	-	-	R	NS	-	-
R160	G95	*	0.89	NS	-	NS	-	S	NS	-	-
R154	-	***	0.07	-	-	-	-	R	NS	-	-
R182	G142	*	0.29	NS	-	NS	-	R	NS	-	-
R161	-	*	0.90	-	-	-	-	S	NS	-	-
R135	G165	***	0.94	NS	-	NS	-	S	NS	-	-
-	G147	-	-	***	0.16	-	-	R	-	-	-
-	G168	-	-	*	0.32	-	-	R	-	-	-
-	G166	-	-	*	0.12	-	-	R	-	-	-
-	G167	-	-	***	0.2	-	-	R	-	-	-
R165	G156	NS	-	***	0.63	NS	-	S	NS	-	-
-	G148	-	-	***	0.18	-	-	R	-	-	-
-	G129	-	-	***	0.12	-	-	R	-	-	-
R183	G10	NS	-	***	0.13	NS	-	R	NS	-	-
R115	G15	NS	-	***	0.22	NS	-	R	NS	-	-
-	G20	-	-	***	0.42	-	-	R	-	-	-
-	G26	-	-	***	0.29	-	-	S	-	-	-
R174	G37	NS	-	***	0.26	NS	-	R	NS	-	-
-	G40	-	-	***	0.06	-	-	R	-	-	-
R38	G41	NS	-	***	0.61	NS	-	S	NS	-	-
R64	G52	NS	-	*	0.08	NS	-	R	NS	-	-
R86	G70	NS	-	***	0.15	NS	-	R	NS	-	-
R180	-	-	-	-	-	-	-	-	*	0.26	R
R185	-	-	-	-	-	-	-	-	*	0.84	R
R125	G88	NS	-	-	-	NS	-	-	*	0.08	R
R122	-	-	-	-	-	-	-	-	*	0.86	R
R127	G154	NS	-	-	-	NS	-	-	***	0.89	R
R10	G92	NS	-	-	-	NS	-	-	***	0.36	R
R24	G158	NS	-	-	-	NS	-	-	***	0.29	S
R27	-	-	-	-	-	-	-	-	***	0.17	R
R29	G39	NS	-	-	-	NS	-	-	***	0.7	R
R30	G175	NS	-	-	-	NS	-	-	***	0.43	S
R41	G46	NS	-	-	-	NS	-	-	***	0.72	R
R44	G90	NS	-	-	-	NS	-	-	***	0.46	S
R61	G111	NS	-	-	-	NS	-	-	*	0.72	R
R62	G50	NS	-	-	-	NS	-	-	*	0.11	R
R75	G61	NS	-	-	-	NS	-	-	***	0.86	R

^a***, **, *: significant association with GLM model, respectively at $P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$, using a permutation test to adjust for experiment-wise type I error.

^b Mean frequency of the detected marker in the haplotype

^c **, *: confirmed linkage, respectively at $P < 0.01$, $P < 0.05$ according to Lander and Kruglyak (1995), i.e. linkage that are significant either in Reunion or Guadeloupe by permutation test and significant at a nominal P value in the other panel.

^d Marker effect in Reunion, Guadeloupe or both R = resistance, S = susceptibility.

The fitting of each phenotypic trait value with an increasing number of significant dimensions showed that minimum BIC was achieved with five dimensions for the SCYLV incidence in the Reunion panel and one dimension in the Guadeloupe panel. For aphid incidence, the BIC was minimal with zero dimension.

Therefore, axes 1 to 5 were used as covariates in the GLM and MLM model for SCYLV incidence trait in Reunion, while the first axe was used in Guadeloupe. No correction for structure was used for aphid incidence trait. Structure covariates had a highly significant effect on virus incidence traits: $P < 0.0001$ ($R^2 = 0.29$) for five axes in Reunion, $P < 0.0001$ ($R^2 = 0.10$) for one axe in Guadeloupe.

Marker – trait associations

Structure had a strong effect on the detection of marker-trait associations. For virus in Reunion, 458 significant markers were detected at the nominal $\alpha = 0.05$ type-1 error level without structure, against 214 markers with structure. For virus in Guadeloupe, 545 significant markers were detected without structure and 334 markers with structure.

Analysis of marker-trait associations with GLM model, using 1,000 permutations for the control of GW type-1 error for SCYLV incidence, revealed 21 significant markers in Reunion, defining 12 independent loci (Tab. 1, Sup. Tab. 2). Seven of these haplotypes were associated with resistance and five with susceptibility. In Guadeloupe (Tab. 1, Sup. Tab. 3), 32 significant associations were detected corresponding to 19 haplotypes. Sixteen of these associations were associated with resistance and three with susceptibility. A total of 30 haplotypes were significantly linked to SCYLV incidence in at least one of the two panels (Tab. 1). Analysis of marker-trait associations with MLM model yielded probability values close to values obtained with GLM model (Sup. Tab. 2 and 3).

Among the markers that were significant either in Reunion or in Guadeloupe, 28 were coded in both panels, defining 17 independent common haplotypes. Among these 17 shared haplotypes, five were co detected or confirmed (Tab. 1): i/ one (R19G11) was detected simultaneously in both panels at the 0.05 GW type-I error level, ii/ four (R13G66, R60G48, R42G34, R36G25) were detected at the 0.05 GW type-I error level in a first panel and detected at the nominal 0.05 type-I error level in the second panel (i.e. confirmed linkage according to Lander and Kruglyak (1995) criterion). Two of these haplotypes were detected in Reunion and were confirmed in Guadeloupe, and two detected in Guadeloupe and confirmed in Reunion.

Analysis of marker-trait associations (GLM model) for resistance to aphids detected 25 significant markers, defining 18 independent haplotypes (Tab. 1, Sup. Tab. 4). Among these haplotypes, 13 were associated with resistance and five with susceptibility. Three haplotypes (R41G68, R16G22 and R37G25) were associated both with aphid and SCYLV incidence, with the same qualitative effect (resistance or susceptibility) for both traits (Tab. 1).

Discussion

In our study, we identified 30 haplotypes significantly associated with SCYLV incidence either in Reunion (12) or Guadeloupe (19) panels, after controlling the population structure effect on a basis of a GW type I error threshold. Twenty two of these haplotypes were associated with resistance and eight with susceptibility. One haplotype was co detected in both panels and four were detected in one panel and confirmed in the other one. This study is the first report for sugarcane of a quantitative trait alleles (QTA) detection based on a cross validation between two independent association mapping studies for sugarcane. Considering the markedly distinct epidemiological conditions prevailing in the two experimental regions (table 2), these five haplotypes co detected in Reunion and Guadeloupe should harbor alleles

determining resistance effects of a broad spectrum nature, rather than specific to a particular viral genotypes.

For resistance to aphids in Reunion, we have detected 25 significant markers, defining 18 independent haplotypes, 13 haplotypes having a positive effect on resistance and five having a negative effect. A significant phenotypic correlation, although modest (0.11) was revealed between aphid incidence and incidence of SCYLV was revealed. Phenotypic correlation value results from genetic and environmental correlation (Gallais 1990). Here, the environmental correlation which was close to zero (probably because aphid infestation was not much variable between trial replications), indicates that the observed significant phenotypic correlation, although low, was almost only due to genetic cause. This finding is congruent with the fact that three haplotypes out of the 18 haplotypes significantly associated with aphid incidence appear also significantly associated with SCYLV incidence in Reunion or in Guadeloupe. Three potential explanations could account for these few haplotypes associated with incidence of both the virus and its vector. The first interpretation deals with the existence of haplotypes possibly gathering genes controlling virus resistance and genes controlling vector resistance. Such clusters of resistance genes, containing insect and disease resistance loci have been described in maize (McMullen and Simcox 1995). The second interpretation is that resistance to aphids is efficient enough to reduce SCYLV transmission. Several authors (van Emden 2007) have claimed the usefulness of breeding for resistance to vector to control infection by semi or persistently transmitted viruses. This has previously been reported on *Triticum monococcum* TM 44 line resistant to *Sitobion avenae* showing reduced BYDV-PAV transmission (Tanguy and Dedryver 2009). Delatte et al. (2006) showed that a resistance to the whitefly vector *Bemisia tabaci* allowed a quantitative resistance to the *Tomato yellow leaf curl virus* in *Lycopersicon pimpinellifolium*. Similarly, Dintinger et al. (2005) demonstrated that resistance to the planthopper vector *Peregrinus maidis* in some maize lines resulted in a

resistance to *Maize stripe virus* and *Maize mosaic virus*. A third interpretation of correlation of virus and aphid incidence could be an increased aphid preference for virus infected plants. This has already been described with the *Potato leafroll virus* (Luteoviridae: *Polerovirus*) in potato, where volatiles from virus infected leaves attracted the aphid *Myzus persicae* (Alvarez et al. 2007).

In the complex highly polyploid and aneuploid genetic context of sugarcane, any cultivar harbor an average of 8 to 12 alleles par locus compared to the 2 ones present in a diploid plant species (D'Hont et al. 1998; Hoarau et al. 2007). Therefore, in sugarcane association studies, the detection of any QTA results from its differential effect compared to the one of a vast genetic background which can be estimated to be about 5-fold greater than in diploid situation, when considering panels of a similar sizes. This particular genetic analysis context based on a much larger background, determined by both high ploidy and heterozygosity levels, is expected to favor the detection of the least or the most useful alleles among the ones governing the trait. Haplotypes associated with SCYLV incidence explained respectively 4 to 8% and 5 to 11% of the phenotypic variation in the Reunion and Guadeloupe panels, while haplotypes significantly associated with aphid infestation explained 5 to 9% of the phenotypic variation. These values are within the same order of magnitude as those found in similar association mapping studies for traits of interest in other crops, such as sorghum (de Alencar Figueiredo et al. 2010) or cotton (Wegrzyn et al. 2010) considering the number of accessions used. From our results, haplotypes potentially useful in breeding for Yellow Leaf resistance were detected and confirm the potential of association mapping studies in sugarcane. Validation of these haplotypes in elite germplasms or in biparental progenies is required in the future.

Acknowledgements

The authors wish to thank A. Anglade, A. Avaby, T. Atiama, C. Hatik, C. Lallemand, M. Payet, L. Poncharville, I. Promi, H. Telismart, R. Tibère, and L. Touby for their technical assistance.

This work was funded by the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), by the Conseil Régional de la Réunion and by the European Union (European regional development fund - ERDF), by ANR grant ANR-08-GENM-001.

References

Abu Ahmad Y, Costet L, Daugrois J-H, Nibouche S, Letourmy P, Girard J-C, Rott P (2007) Variation in Infection capacity and in virulence exists between genotypes of *Sugarcane yellow leaf virus*. Plant Disease 91:253-259

Abu Ahmad Y, Rassaby L, Royer M, Borg Z, Braithwaite KS, Mirkov TE, Irely MS, Perrier X, Smith GR, Rott P (2006a) Yellow leaf of sugarcane is caused by at least three different genotypes of *Sugarcane yellow leaf virus*, one of which predominates on the Island of Reunion. Archives of Virology 151:1355-1371

Abu Ahmad Y, Royer M, Daugrois J-H, Costet L, Lett J-M, Victoria JJ, Girard J-C, P. R (2006b) Geographical distribution of four *Sugarcane yellow leaf virus* genotypes. Plant-disease 90:1156-1160

Akbar W, Showler AT, Reagan TE, White WH (2010) Categorizing sugarcane cultivar resistance to the sugarcane aphid and yellow sugarcane aphid (Hemiptera: Aphididae). Journal of Economic Entomology 103:1431-1437

Alvarez AE, Garzo E, Verbeek M, Vosman B, Dicke M, Tjallingii WF (2007) Infection of potato plants with potato leafroll virus changes attraction and feeding behaviour of *Myzus persicae*. Entomologia Experimentalis et Applicata 125:135-144

416 Bolker BM, Brooks ME, Clark CJ, Geange SW, Poulsen JR, Stevens MHH, White J-SS
 417 (2008) Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution.
 418 Trends in Ecology and Evolution 24:127-135

419 Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES (2007) TASSEL:
 420 software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics
 421 23:2633-2635

422 Breseghello F, Sorrells ME (2006) Association mapping of kernel size and milling quality in
 423 wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Genetics 172:1165-1177

424 Carlson CS, Eberle MA, Kruglyak L, Nickerson DA (2004) Mapping complex disease loci in
 425 whole-genome association studies. Nature 429:446-452

426 Comstock JC, Miller JD, Schnell RJ (2001) Incidence of *Sugarcane yellow leaf virus* in
 427 clones maintained in the world collection of sugarcane and related grasses at the United
 428 States National Repository in Miami, Florida. Sugar-Tech 3:128-133

429 D'Arcy C, Domier L (2005) Virus taxonomy. VIIIth Report of the International Committee on
 430 Taxonomy of Viruses. In: Fauquet C, Mayo M, Maniloff J, Desselberger U, Ball L (eds)
 431 Luteoviridae. Elsevier Academic Press, New York, pp 891-900

432 D'Hont A, Ison D, Alix K, Roux C, Glaszmann JC (1998) Determination of basic
 433 chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA
 434 genes. Genome 41:221-225

435 de Alencar Figueiredo L, Sine B, Chantereau J, Mestres C, Fliedel G, Rami JF, Glaszmann
 436 JC, Deu M, Courtois B (2010) Variability of grain quality in sorghum: association with
 437 polymorphism in *Sh2*, *Bt2*, *SssI*, *Ae1*, *Wx* and *O2*. Theoretical and Applied Genetics
 438 121:1171-1185

439 Delatte H, Holota H, Reynaud B, Dintinger J (2006) Characterisation of a quantitative
 440 resistance to vector transmission of *Tomato yellow leaf curl virus* in *Lycopersicon*
 441 *pimpinellifolium*. European Journal of Plant Pathology 114:245-253
 442 Dintinger J, Boissot N, Chiroleu F, Hamon P, Reynaud B (2005) Evaluation of maize inbreds
 443 for *Maize stripe virus* and *Maize mosaic virus* resistance: disease progress in relation to
 444 time and the cumulative number of planthoppers. Phytopathology 95:600-607
 445 Flint-Garcia SA, Thornsberry JM, Buckler IV ES (2003) Structure of linkage disequilibrium
 446 in plant. Annual Review of Plant Biology 54:357-374
 447 Gallais A (1990) Théorie de la sélection en amélioration des plantes, Masson Ed., Paris,
 448 France
 449 Heller-Uszynska K, Uszynski G, Huttner E, Evers M, Carlig J, Caig V, Aitken K, Jackson P,
 450 Piperidis G, Cox M, Gilmour R, D'Hont A, Butterfield M, Glaszmann J-C, Kilian A (In
 451 press) Diversity Arrays Technology effectively reveals DNA polymorphism in a large
 452 and complex genome of sugarcane. Molecular Breeding:1-19
 453 Hoarau JY, Offmann B, D'Hont A, Risterucci AM, Roques D, Glaszmann JC, Grivet L
 454 (2001) Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). I. Genome
 455 mapping with AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics 103:84-97
 456 Hoarau JY, Souza G, D'Hont A, Menoss iM, Pinto LR, Pereira de Souza A, Grivet L, Menck
 457 CF, Ulian EC, Vincentz M (2007) Sugarcane, a tropical crop with a highly complex
 458 genome. In: F. M-GJ, Lea P, Briat JF (eds) Functional Plant Genomics. Science
 459 Publishers, Enfield NH, USA, pp 481-499
 460 Jannoo N, Grivet L, Dookun A, D'Hont A, Glaszmann JC (1999) Linkage disequilibrium
 461 among modern sugarcane cultivars. Theoretical and Applied Genetics 99:1053-1060

462 Komor E (2010) Susceptibility of sugarcane, plantation weeds and grain cereals to infection
 463 by *Sugarcane yellow leaf virus* and selection by sugarcane breeding in Hawaii.
 464 European Journal of Plant Pathology 129:379-388

465 Lander E, Kruglyak L (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting
 466 and reporting linkage results. Nature Genetics 11:241-247

467 Littell RC, Milliken GA, Stroup WW, Wolfinger RD, Schabenberger O (2006) SAS system for
 468 mixed models, second edition. SAS Institute Inc., Cary, NC

469 McMullen M, Simcox K (1995) Genomic organization of disease and insect resistance genes
 470 in maize. Molecular Plant-Microbe Interactions 8:811-815

471 Morgante M, Salamini F (2003) From plant genomics to breeding practice. Current Opinion
 472 in Biotechnology 14:214-219

473 Nordborg M, Tavaré S (2002) Linkage disequilibrium: what history has to tell us. Trends in
 474 Genetics 18:83-90

475 Patterson N, Price AL, Reich D (2006) Population structure and eigenanalysis. PLoS Genet
 476 2:2074-2092

477 Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P (2000) Association mapping in
 478 structured populations. The American Journal of Human Genetics 67:170-181

479 Raboin L-M, Pauquet J, Butterfield M, D'Hont A, Glaszmann J-C (2008) Analysis of
 480 genome-wide linkage disequilibrium in the highly polyploid sugarcane. Theoretical and
 481 Applied Genetics 116:701-714

482 Raboin L, Oliveira K, Lecunff L, Telismart H, Roques D, Butterfield M, Hoarau J, D'Hont A
 483 (2006) Genetic mapping in sugarcane, a high polyploid, using bi-parental progeny:
 484 identification of a gene controlling stalk colour and a new rust resistance gene.
 485 Theoretical and Applied Genetics 112:1382-1391

486 Raboin LM (2005) Génétique de la résistance au charbon de la canne à sucre causé par
 487 *Ustilago scitaminea* : caractérisation de la diversité génétique du pathogène,
 488 cartographie de QTL dans un croisement bi-parental et étude d'associations dans une
 489 population de cultivars modernes. Thèse de Doctorat, ENSAM, Montpellier, France,
 490 119 pp

491 Rafalski A, Morgante M (2004) Corn and humans: recombination and linkage disequilibrium
 492 in two genomes of similar size. Trends in Genetics 20:103-111

493 Rassaby L, Girard JC, Lemaire O, Costet L, Irey MS, Kodja H, Lockhart BEL, Rott P (2004)
 494 Spread of *Sugarcane yellow leaf virus* in sugarcane plants and fields on the island of
 495 Reunion. Plant-Pathology 53:117-125

496 Rassaby L, Girard JC, Letourmy P, Chaume J, Irey MS, Lockhart BEL, Kodja H, Rott P
 497 (2003) Impact of *Sugarcane yellow leaf virus* on sugarcane yield and juice quality in
 498 Réunion Island. European Journal of Plant Pathology 109:459-466

499 Rott P, Mirkov TE, Schenck S, Girard JC (2008) Recent advances in research on *Sugarcane*
 500 *yellow leaf virus*, the causal agent of sugarcane yellow leaf. Sugar Cane International
 501 26:18-27

502 SAS Institute (2008) SAS OnlineDoc® 9.2. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA

503 Schenck S (1990) Yellow leaf syndrome—a new sugarcane disease. In: Annual Report 1990 of
 504 the Hawaiian Sugar Planters Association, p 38

505 Schenck S (1997) Advances in control of yellow leaf syndrome. Hawaii Agriculture Research
 506 Center, Pathology Report 67:1-4

507 Schenck S, Hu JS, Lockhart BE (1997) Use of a tissue blot immunoassay to determine the
 508 distribution of *Sugarcane yellow leaf virus* in Hawaii. Sugar Cane 4:5-8

509 Schenck S, Lehrer AT (2000) Factors affecting the transmission and spread of *Sugarcane*
 510 *yellow leaf virus*. Plant Disease 84:1085-1088

511 Tanguy S, Dedryver CA (2009) Reduced BYDV–PAV transmission by the grain aphid in a
 512 *Triticum monococcum* line. European Journal of Plant Pathology 123:281-289
 513 van Emden H (2007) Host-plant resistance. In: van Emden H, Harrington R (eds) Aphids as
 514 crop pests. CAB International, Wallingford, UK, pp 447-468
 515 Vega J, Scagliusi SMM, Ulian EC (1997) Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: Evidence
 516 of association with a luteovirus. Plant Disease 81:21-26
 517 Viswanathan R, Balamuralikrishnan M, Karuppaiah R (2008) Identification of three
 518 genotypes of *Sugarcane yellow leaf virus* causing yellow leaf disease from India and
 519 their molecular characterization. Virus Genes 37:368-379
 520 Wang MQ, Zhou GH (2010) A near-complete genome sequence of a distinct isolate of
 521 *Sugarcane yellow leaf virus* from China, representing a sixth new genotype. Virus
 522 Genes 41:268-272
 523 Wegrzyn JL, Eckert AJ, Choi M, Lee JM, Stanton BJ, Sykes R, Davis MF, Tsai C-J, Neale
 524 DB (2010) Association genetics of traits controlling lignin and cellulose biosynthesis in
 525 black cottonwood (*Populus trichocarpa*, Salicaceae) secondary xylem. New Phytologist
 526 188:515-532
 527 Wei X, Jackson P, McIntyre C, Aitken K, Croft B (2006) Associations between DNA markers
 528 and resistance to diseases in sugarcane and effects of population substructure.
 529 Theoretical and Applied Genetics 114:155-164
 530 Wei X, Jackson PA, Hermann S, Kilian A, Heller-Uszynska K, Deomano E (2010)
 531 Simultaneously accounting for population structure, genotype by environment
 532 interaction, and spatial variation in marker-trait associations in sugarcane. Genome
 533 53:973-981
 534 Yu J, Pressoir G, Briggs WH, Vroh Bi I, Yamasaki M, Doebley JF, McMullen MD, Gaut BS,
 535 Nielsen DM, Holland JB, Kresovich S, Buckler ES (2006) A unified mixed-model

536 method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature*
537 *Genetics* 38:203-208

538 Zhu C, Gore M, Buckler ES, Yu J (2008) Status and prospects of association mapping in
539 plants. *The Plant Genome* 1:5-20

540 Zhu C, Yu J (2009) Nonmetric multidimensional scaling corrects for population structure in
541 association mapping with different sample types. *Genetics* 182:875-888

542

Supplementary material table 1 (1/5): list of the 344 cultivars associated panel Guadeloupe, Reunion or both, genotypic estimate values of SCYLV incidence for both panels and *Melanaphis sacchari* incidence in Reunion.

Cultivar label (2)	Cultivar panels (3)	% virus infected stalks								Aphids AUIPC (% infested leaves.day) (1)		
		Guadeloupe				Reunion				Reunion		
		mean	LCL95 (4)	UCL95 (4)	Virus genotype (5)	mean	LCL95 (4)	UCL95 (4)	Virus genotype (5)	mean	SEM (6)	status (7)
Var-1	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	73.1	3.3	S
Var-2	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	44.0	15.9	I
Var-3	GUA/REU	98.4	91.2	100.0	BCR	100.0	88.4	100.0	R	40.7	6.5	I
Var-4	REU	-	-	-	-	100.0	83.2	100.0	R	32.3	4.7	I
Var-5	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	59.1	6.6	S
Var-6	GUA	53.3	40.0	66.3	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-7	GUA	60.0	45.2	73.6	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-8	GUA	100.0	94.1	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-9	GUA	100.0	94.0	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-10	GUA	62.5	48.5	75.1	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-11	GUA	53.3	40.0	66.3	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-12	GUA	100.0	89.7	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-13	GUA	98.3	91.1	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-14	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	61.2	14.8	I
Var-15	GUA	90.0	79.5	96.2	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-16	REU	-	-	-	-	0.0	0.0	11.6	-	44.8	5.3	I
Var-17	GUA	93.8	79.2	99.2	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-18	REU	-	-	-	-	96.4	81.7	99.9	R	84.8	12.1	S
Var-19	REU	-	-	-	-	100.0	87.7	100.0	R	67.9	11.8	I
Var-20	GUA	100.0	94.1	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-21	GUA	100.0	94.0	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-22	GUA	100.0	94.0	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-23	GUA	100.0	94.1	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-24	GUA	95.0	86.1	99.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-25	GUA	100.0	94.0	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-26	GUA	100.0	94.0	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-27	GUA	96.7	88.7	99.6	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-28	GUA	98.3	91.1	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-29	GUA	85.2	73.8	93.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-30	GUA	100.0	93.7	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-31	GUA	93.3	83.8	98.2	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-32	GUA	81.7	69.6	90.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-33	GUA	86.7	75.4	94.1	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-34	GUA	67.2	53.7	79.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-35	GUA	98.2	90.6	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-36	GUA	85.5	73.3	93.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-37	GUA	100.0	94.0	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-38	GUA	96.7	88.5	99.6	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-39	GUA	81.7	69.6	90.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-40	GUA	87.0	75.1	94.6	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-41	GUA	62.7	49.1	75.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-42	GUA	96.3	87.3	99.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-43	GUA	94.9	85.9	98.9	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-44	GUA	57.9	44.1	70.9	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-45	GUA	3.4	0.4	11.9	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-46	GUA	100.0	93.9	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-47	GUA	60.0	45.2	73.6	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-48	GUA	70.5	57.4	81.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-49	GUA	100.0	94.0	100.0	CR	-	-	-	-	-	-	-
Var-50	GUA	80.0	67.7	89.2	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-51	GUA	92.0	80.8	97.8	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-52	GUA	98.3	90.9	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-53	GUA	60.0	46.5	72.4	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-54	GUA	100.0	93.5	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-55	GUA	55.7	42.4	68.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-56	GUA	52.5	39.3	65.4	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-57	GUA	65.0	51.6	76.9	BC	-	-	-	-	-	-	-
Var-58	GUA	41.7	29.1	55.1	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-59	GUA	78.2	65.0	88.2	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-60	GUA	86.7	75.4	94.1	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-61	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	26.7	3.1	R
Var-62	REU	-	-	-	-	0.0	0.0	11.6	-	43.4	11.4	I
Var-63	REU	-	-	-	-	69.0	49.2	84.7	R	32.3	7.1	I
Var-64	GUA	98.3	91.1	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-65	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	BR	25.8	3.5	I
Var-66	REU	-	-	-	-	100.0	87.2	100.0	R	34.6	11.5	I
Var-67	GUA	56.7	43.2	69.4	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-68	REU	-	-	-	-	16.7	5.6	34.7	R	92.4	19.2	S
*Var-69	REU	-	-	-	-	100	86.3	100	R	39.4	11.1	I
Var-70	GUA	16.7	8.3	28.5	na	-	-	-	-	-	-	-
Var-71	GUA	93.5	84.3	98.2	BC	-	-	-	-	-	-	-
Var-72	GUA	100.0	93.8	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-73	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	36.5	7.4	I
Var-74	GUA/REU	21.7	12.1	34.2	na	0.0	0.0	11.9	-	26.0	3.0	R
Var-75	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	71.3	3.8	S

to be continued

Supplementary material table 1 (2/5): list of the 344 cultivars associated panel Guadeloupe, Reunion or both, genotypic estimate values of SCYLV incidence for both panels and *Melanaphis sacchari* incidence in Reunion.

Cultivar label (2)	Cultivar panels (3)	% virus infected stalks								Aphids AUIPC (% infested leaves.day) (1)		
		Guadeloupe				Reunion				Reunion		
		mean	LCL95 (4)	UCL95 (4)	Virus genotype (5)	mean	LCL95 (4)	UCL95 (4)	Virus genotype (5)	mean	SEM (6)	status (7)
Var-76	GUA	6.7	1.8	16.2	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-77	REU	-	-	-	-	3.4	0.1	17.8	na	22.9	3.2	R
Var-78	GUA/REU	1.7	0.0	8.9	-	4.2	0.1	21.1	na	56.1	11.1	I
Var-79	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	48.0	3.7	I
Var-80	REU	-	-	-	-	100.0	87.2	100.0	R	57.1	5.0	I
Var-81	REU	-	-	-	-	100.0	87.2	100.0	R	51.6	8.5	I
Var-82	GUA	56.7	43.2	69.4	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-83	GUA	90.0	79.5	96.2	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-84	GUA	15.7	7.0	28.6	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-85	GUA	93.4	84.1	98.2	BCR	-	-	-	-	-	-	-
Var-86	GUA	100.0	93.7	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-87	GUA	98.3	91.1	100.0	BCR	-	-	-	-	-	-	-
Var-88	REU	-	-	-	-	0.0	0.0	11.9	-	36.2	5.7	I
Var-89	GUA/REU	3.4	0.4	11.9	na	0.0	0.0	11.6	-	38.5	1.7	I
Var-90	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	91.3	17.8	S
Var-91	GUA	96.7	88.7	99.6	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-92	GUA	52.5	39.3	65.4	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-93	GUA	65.0	51.6	76.9	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-94	GUA	95.0	86.1	99.0	C	-	-	-	-	-	-	-
Var-95	REU	-	-	-	-	56.7	37.4	74.5	R	43.3	3.0	I
Var-96	GUA/REU	100.0	94.1	100.0	CR	100.0	88.4	100.0	B	38.0	4.9	I
Var-97	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	62.2	14.2	I
Var-98	GUA	46.7	33.7	60.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-99	GUA	80.3	68.2	89.4	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-100	REU	-	-	-	-	32.1	15.9	52.4	R	59.9	6.3	I
Var-101	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	33.0	12.3	I
Var-102	GUA	33.3	21.7	46.7	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-103	REU	-	-	-	-	89.3	71.8	97.7	R	41.0	9.8	I
Var-104	REU	-	-	-	-	100.0	84.6	100.0	BR	66.7	23.0	I
Var-105	REU	-	-	-	-	10.0	2.1	26.5	na	33.8	10.4	I
Var-106	GUA/REU	25.0	14.7	37.9	-	26.7	12.3	45.9	R	40.6	13.4	I
Var-107	GUA	80.0	67.7	89.2	BC	-	-	-	-	-	-	-
Var-108	GUA	96.4	87.7	99.6	BCR	-	-	-	-	-	-	-
Var-109	GUA	100.0	94.0	100.0	BCR	-	-	-	-	-	-	-
Var-110	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	42.6	4.4	I
Var-111	GUA	100.0	69.1	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-112	GUA	91.1	80.4	97.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-113	REU	-	-	-	-	100.0	85.2	100.0	R	57.9	8.9	I
Var-114	GUA	90.0	79.5	96.2	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-115	GUA	83.9	71.7	92.4	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-116	GUA	73.3	60.3	83.9	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-117	GUA	41.0	28.6	54.3	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-118	GUA	100.0	94.0	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-119	GUA	85.0	73.4	92.9	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-120	GUA	100.0	93.7	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-121	GUA	93.3	83.8	98.2	-	-	-	-	-	-	-	-
*Var-122	REU	-	-	-	-	0.0	0.0	11.6	-	37.8	14.1	I
Var-123	GUA/REU	73.3	60.3	83.9	BCR	100.0	86.8	100.0	R	21.1	7.4	R
Var-124	GUA	100.0	94.0	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-125	GUA	100.0	94.0	100.0	BCR	-	-	-	-	-	-	-
Var-126	GUA	86.9	75.8	94.2	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-127	REU	-	-	-	-	40.0	22.7	59.4	R	23.1	0.3	R
Var-128	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	BR	36.5	5.5	I
Var-129	REU	-	-	-	-	56.7	37.4	74.5	R	54.5	13.2	I
Var-130	REU	-	-	-	-	86.7	69.3	96.2	R	106.6	20.4	S
Var-131	REU	-	-	-	-	66.7	47.2	82.7	R	44.0	7.0	I
Var-132	GUA	75.0	62.1	85.3	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-133	GUA	93.3	83.8	98.2	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-134	GUA	28.3	17.5	41.4	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-135	GUA	70.0	56.8	81.2	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-136	GUA	100.0	94.1	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-137	GUA	100.0	94.1	100.0	BCR	-	-	-	-	-	-	-
Var-138	GUA/REU	72.9	59.7	83.6	-	13.3	3.8	30.7	R	50.9	8.2	I
Var-139	GUA	69.5	56.1	80.8	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-140	GUA	100.0	94.1	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-141	GUA	61.7	48.2	73.9	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-142	GUA	61.7	48.2	73.9	BC	-	-	-	-	-	-	-
Var-143	GUA	88.3	77.4	95.2	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-144	GUA	72.4	59.1	83.3	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-145	REU	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	.	I
Var-146	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	48.3	12.8	I
Var-147	REU	-	-	-	-	20.8	7.1	42.2	R	65.0	12.7	I
Var-148	REU	-	-	-	-	100.0	87.2	100.0	BR	69.8	4.3	S
Var-149	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	50.1	14.4	I
Var-150	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	B	63.7	6.5	I

to be continued

Supplementary material table 1 (3/5): list of the 344 cultivars associated panel Guadeloupe, Reunion or both, genotypic estimate values of SCYLV incidence for both panels and *Melanaphis sacchari* incidence in Reunion.

Cultivar label (2)	Cultivar panels (3)	% virus infected stalks								Aphids AUIPC (% infested leaves.day) (1)		
		Guadeloupe				Reunion				Reunion		
		mean	LCL95 (4)	UCL95 (4)	Virus genotype (5)	mean	LCL95 (4)	UCL95 (4)	Virus genotype (5)	mean	SEM (6)	status (7)
Var-151	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	B	63.1	13.5	I
Var-152	REU	-	-	-	-	13.8	3.9	31.7	R	70.4	14.6	I
Var-153	REU	-	-	-	-	6.7	0.8	22.1	R	66.2	6.4	S
Var-154	GUA	67.8	54.4	79.4	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-155	GUA	80.3	68.2	89.4	BCR	-	-	-	-	-	-	-
Var-156	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	56.3	10.4	I
Var-157	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	71.1	21.7	I
Var-158	GUA	100.0	94.0	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-159	GUA	59.3	45.7	71.9	CR	-	-	-	-	-	-	-
Var-160	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	44.4	4.7	I
Var-161	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	42.9	5.7	I
Var-162	GUA	95.0	86.1	99.0	BC	-	-	-	-	-	-	-
Var-163	GUA	100.0	92.9	100.0	CR	-	-	-	-	-	-	-
Var-164	GUA	96.3	87.3	99.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-165	REU	-	-	-	-	0.0	0.0	11.6	-	36.9	11.3	I
Var-166	REU	-	-	-	-	0.0	0.0	11.9	-	23.2	1.0	R
Var-167	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	B	22.2	6.2	R
Var-168	GUA	7.1	2.0	17.3	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-169	GUA/REU	25.0	14.7	37.9	-	50.0	31.3	68.7	R	30.1	4.9	I
Var-170	GUA	1.7	0.0	8.9	C	-	-	-	-	-	-	-
Var-171	GUA	49.2	36.1	62.3	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-172	REU	-	-	-	-	100.0	86.3	100.0	na	39.3	6.7	I
Var-173	GUA	15.0	7.1	26.6	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-174	GUA	1.7	0.0	8.9	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-175	GUA	36.7	24.6	50.1	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-176	REU	-	-	-	-	6.9	0.8	22.8	R	32.2	5.4	I
Var-177	REU	-	-	-	-	3.4	0.1	17.8	R	30.9	1.7	I
Var-178	REU	-	-	-	-	7.4	0.9	24.3	R	45.4	11.6	I
Var-179	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	33.4	2.4	I
Var-180	REU	-	-	-	-	0.0	0.0	11.6	-	27.5	8.3	R
Var-181	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	63.2	8.8	I
Var-182	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	50.9	14.2	I
Var-183	REU	-	-	-	-	100.0	87.7	100.0	R	41.9	5.4	I
Var-184	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	58.3	10.5	I
Var-185	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	53.2	3.3	I
Var-186	REU	-	-	-	-	100.0	85.2	100.0	R	61.6	7.4	I
Var-187	REU	-	-	-	-	100.0	85.8	100.0	R	43.2	4.3	I
Var-188	REU	-	-	-	-	100.0	86.3	100.0	R	46.2	13.1	I
Var-189	GUA/REU	100.0	94.0	100.0	CR	89.7	72.6	97.8	BR	31.6	7.3	I
Var-190	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	48.9	13.8	I
Var-191	REU	-	-	-	-	14.8	4.2	33.7	R	53.7	13.3	I
*Var-192	GUA	26.7	16.1	39.7	CR	-	-	-	-	-	-	-
Var-193	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	30.0	6.4	I
*Var-194	REU	-	-	-	-	30.0	14.7	49.4	R	34.0	5.4	I
Var-195	REU	-	-	-	-	100.0	83.2	100.0	R	24.4	7.0	I
Var-196	GUA	100.0	93.9	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-197	GUA	90.2	79.8	96.3	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-198	GUA	100.0	93.9	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-199	GUA	98.4	91.2	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-200	GUA	96.8	88.8	99.6	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-201	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	47.3	13.6	I
Var-202	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	36.9	11.0	I
Var-203	GUA	100.0	94.0	100.0	CR	-	-	-	-	-	-	-
Var-204	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	45.0	23.6	I
Var-205	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	26.7	5.0	I
Var-206	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	28.4	5.2	I
Var-207	GUA	60.0	46.5	72.4	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-208	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	63.4	24.1	I
Var-209	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	53.3	6.0	I
Var-210	GUA	81.7	69.6	90.5	BCR	-	-	-	-	-	-	-
Var-211	GUA	43.3	30.6	56.8	R	-	-	-	-	-	-	-
Var-212	REU	-	-	-	-	55.0	31.5	76.9	R	38.9	11.2	I
Var-213	GUA/REU	0.0	0.0	6.0	C	0.0	0.0	11.6	-	80.0	4.4	S
Var-214	GUA	88.3	77.4	95.2	BCR	-	-	-	-	-	-	-
Var-215	GUA	100.0	94.0	100.0	C	-	-	-	-	-	-	-
Var-216	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	50.7	14.6	I
Var-217	GUA	100.0	89.1	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-218	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	35.8	8.0	I
Var-219	GUA	76.7	64.0	86.6	BCR	-	-	-	-	-	-	-
Var-220	GUA	55.0	41.6	67.9	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-221	GUA	100.0	94.1	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-222	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	50.2	2.9	I
Var-223	GUA	100.0	94.1	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-224	GUA	3.3	0.4	11.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Var-225	GUA/REU	57.4	43.2	70.8	BCR	30.0	14.7	49.4	R	24.4	7.5	I

to be continued

Supplementary material table 1 (4/5): list of the 344 cultivars associated panel Guadeloupe, Reunion or both, genotypic estimate values of SCYLV incidence for both panels and *Melanaphis sacchari* incidence in Reunion.

Cultivar label (2)	Cultivar panels (3)	% virus infected stalks								Aphids AUIPC (% infested leaves.day) (1)		
		Guadeloupe				Reunion				Reunion		
		mean	LCL95 (4)	UCL95 (4)	Virus genotype (5)	mean	LCL95 (4)	UCL95 (4)	Virus genotype (5)	mean	SEM (6)	status (7)
Var-226	GUA/REU	100.0	93.9	100.0	BCR	100.0	86.3	100.0	R	51.4	9.8	I
Var-227	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	43.2	4.7	I
Var-228	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	40.6	5.4	I
Var-229	REU	-	-	-	-	100.0	87.7	100.0	R	28.8	7.4	I
*Var-230	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	38.0	3.5	I
var-231	GUA/REU	100.0	94.0	100.0	C	100.0	88.4	100.0	R	56.7	13.0	I
var-232	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	57.4	3.8	I
var-233	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	66.4	12.6	I
var-234	GUA	95.0	86.1	99.0	-	-	-	-	-	-	-	-
var-235	REU	-	-	-	-	23.3	9.9	42.3	R	22.8	5.5	R
var-236	GUA	5.0	1.0	13.9	-	-	-	-	-	-	-	-
var-237	REU	-	-	-	-	100.0	66.4	100.0	R	65.2	0.0	I
var-238	REU	-	-	-	-	100.0	78.2	100.0	R	125.5	13.1	S
var-239	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	60.8	6.8	I
var-240	GUA	93.4	84.1	98.2	-	-	-	-	-	-	-	-
var-241	GUA	82.7	69.7	91.8	BCR	-	-	-	-	-	-	-
var-242	REU	-	-	-	-	46.7	28.3	65.7	R	31.6	5.7	I
var-243	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	29.9	9.7	I
var-244	GUA	96.7	88.7	99.6	-	-	-	-	-	-	-	-
var-245	GUA	68.3	55.0	79.7	-	-	-	-	-	-	-	-
var-246	GUA	20.0	10.8	32.3	-	-	-	-	-	-	-	-
var-247	GUA	30.0	18.8	43.2	-	-	-	-	-	-	-	-
var-248	REU	-	-	-	-	93.1	77.2	99.2	R	50.1	12.8	I
var-249	GUA	100.0	92.9	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
var-250	GUA	93.1	83.3	98.1	-	-	-	-	-	-	-	-
var-251	GUA	3.3	0.4	11.5	-	-	-	-	-	-	-	-
var-252	REU	-	-	-	-	100.0	80.5	100.0	R	74.9	1.7	I
var-253	GUA	91.7	81.6	97.2	-	-	-	-	-	-	-	-
var-254	GUA	98.3	91.1	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
var-255	GUA	96.7	88.5	99.6	-	-	-	-	-	-	-	-
var-256	REU	-	-	-	-	37.5	8.5	75.5	R	33.8	0.0	I
var-257	GUA/REU	98.4	91.2	100.0	-	100.0	88.4	100.0	R	41.8	7.0	I
var-258	GUA/REU	100.0	94.0	100.0	BCR	100.0	88.4	100.0	R	43.6	5.5	I
var-259	REU	-	-	-	-	3.3	0.1	17.2	R	54.9	9.7	I
var-260	GUA	67.2	54.0	78.7	-	-	-	-	-	-	-	-
var-261	GUA	81.7	69.6	90.5	-	-	-	-	-	-	-	-
var-262	REU	-	-	-	-	10.3	2.2	27.4	na	47.5	17.9	I
var-263	GUA	52.5	39.1	65.7	BC	-	-	-	-	-	-	-
var-264	GUA	58.3	44.9	70.9	-	-	-	-	-	-	-	-
var-265	REU	-	-	-	-	100.0	85.2	100.0	R	84.3	45.8	S
var-266	REU	-	-	-	-	20.0	7.7	38.6	R	54.1	7.8	I
var-267	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	24.1	8.8	R
var-268	REU	-	-	-	-	100.0	87.7	100.0	R	36.1	2.9	I
var-269	REU	-	-	-	-	13.3	3.8	30.7	R	16.5	1.7	R
var-270	GUA/REU	51.7	38.4	64.8	CR	10.0	2.1	26.5	R	26.5	5.9	R
var-271	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	62.5	10.8	S
var-272	REU	-	-	-	-	27.6	12.7	47.2	R	21.8	6.5	R
var-273	REU	-	-	-	-	0.0	0.0	18.5	-	24.7	4.8	R
var-274	GUA	21.3	11.9	33.7	-	-	-	-	-	-	-	-
var-275	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	17.7	2.0	R
var-276	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	38.6	4.1	I
var-277	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	59.2	1.6	I
var-278	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	41.8	8.7	I
var-279	GUA	20.3	11.0	32.8	-	-	-	-	-	-	-	-
var-280	GUA/REU	78.3	65.8	87.9	CR	100.0	88.4	100.0	R	42.3	4.3	I
var-281	GUA/REU	5.0	1.0	13.9	-	0.0	0.0	11.9	-	54.0	5.0	I
var-282	GUA/REU	56.7	43.2	69.4	CR	26.7	12.3	45.9	R	39.5	9.2	I
var-283	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	36.9	3.1	I
var-284	GUA/REU	100.0	94.0	100.0	BCR	100.0	88.4	100.0	R	52.2	6.5	I
var-285	GUA/REU	100.0	94.1	100.0	CR	100.0	88.4	100.0	R	40.2	1.4	I
var-286	GUA/REU	33.3	21.7	46.7	BCR	100.0	85.8	100.0	BR	28.8	3.8	I
var-287	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	B	50.2	15.9	I
var-288	GUA/REU	82.0	70.0	90.6	BC	100.0	88.4	100.0	R	60.0	15.1	I
var-289	REU	-	-	-	-	92.6	75.7	99.1	R	29.9	11.9	I
var-290	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	57.6	11.2	I
var-291	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	49.5	10.1	I
var-292	REU	-	-	-	-	37.9	20.7	57.7	R	42.5	4.2	I
var-293	REU	-	-	-	-	100.0	87.2	100.0	R	58.6	12.3	I
var-294	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	43.1	13.7	I
var-295	GUA/REU	90.0	79.5	96.2	BC	100.0	88.4	100.0	R	50.1	7.0	I
var-296	REU	-	-	-	-	86.7	69.3	96.2	R	49.7	7.5	I
var-297	REU	-	-	-	-	83.3	65.3	94.4	R	65.3	19.5	S
var-298	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	53.1	6.5	I
var-299	REU	-	-	-	-	3.3	0.1	17.2	R	52.0	11.2	I
var-300	GUA	95.0	86.1	99.0	-	-	-	-	-	-	-	-

to be continued

Supplementary material table 1 (5/5): list of the 344 cultivars associated panel Guadeloupe, Reunion or both, genotypic estimate values of SCYLV incidence for both panels and *Melanaphis sacchari* incidence in Reunion.

		% virus infected stalks								Aphids AUIPC (% infested leaves.day) (1)		
		Guadeloupe				Reunion				Reunion		
		mean	LCL95 (4)	UCL95 (4)	Virus genotype (5)	mean	LCL95 (4)	UCL95 (4)	Virus genotype (5)	mean	SEM (6)	status (7)
Cultivar label (2)	Cultivar panels (3)											
var-301	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	50.7	9.3	I
var-302	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	38.5	5.0	I
var-303	GUA/REU	33.3	21.7	46.7	BCR	0.0	0.0	11.6	-	26.5	8.5	I
var-304	REU	-	-	-	-	20.7	8.0	39.7	R	45.9	6.1	I
var-305	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	29.7	2.4	I
var-306	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	20.0	4.9	R
var-307	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	36.6	5.2	I
var-308	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	35.0	4.7	I
var-309	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	38.1	13.3	I
var-310	REU	-	-	-	-	43.3	25.5	62.6	R	51.7	10.0	I
var-311	REU	-	-	-	-	46.7	28.3	65.7	R	24.1	7.3	R
var-312	REU	-	-	-	-	0.0	0.0	11.6	-	48.2	3.9	I
var-313	REU	-	-	-	-	53.3	34.3	71.7	R	44.8	11.3	I
var-314	REU	-	-	-	-	53.3	34.3	71.7	R	39.1	4.9	I
var-315	REU	-	-	-	-	0.0	0.0	11.6	-	51.7	8.0	I
var-316	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	47.6	12.0	I
var-317	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	29.3	6.9	I
var-318	REU	-	-	-	-	0.0	0.0	11.6	-	24.5	4.6	R
var-319	REU	-	-	-	-	33.3	17.3	52.8	R	53.4	4.3	I
var-320	GUA	100.0	93.7	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
var-321	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	50.8	7.2	I
var-322	GUA	100.0	94.0	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
var-323	GUA	93.3	83.8	98.2	-	-	-	-	-	-	-	-
var-324	GUA	98.3	91.1	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
var-325	GUA	98.3	91.1	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
var-326	GUA/REU	77.6	64.7	87.5	CR	100.0	88.4	100.0	R	35.2	7.3	I
var-327	REU	-	-	-	-	0.0	0.0	11.9	-	78.6	7.1	S
var-328	REU	-	-	-	-	0.0	0.0	11.9	-	28.6	4.6	I
var-329	GUA	66.7	53.3	78.3	-	-	-	-	-	-	-	-
var-330	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	47.8	6.3	I
var-331	GUA/REU	91.7	81.6	97.2	BCR	100.0	88.4	100.0	R	41.4	6.3	I
var-332	GUA	98.4	91.2	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
var-333	REU	-	-	-	-	0.0	0.0	11.6	-	55.8	8.7	I
*var-334	GUA	100.0	93.4	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
var-335	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	B	30.2	9.0	I
var-336	GUA/REU	60.0	46.5	72.4	BCR	100.0	88.4	100.0	R	50.8	10.4	I
var-337	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	R	21.5	8.5	R
var-338	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	51.8	12.1	I
var-339	GUA	100.0	94.0	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
var-340	REU	-	-	-	-	65.5	45.7	82.1	R	45.4	3.9	I
var-341	REU	-	-	-	-	100.0	88.1	100.0	R	53.3	10.1	I
var-342	REU	-	-	-	-	100.0	88.4	100.0	BR	66.5	8.4	I
var-343	REU	-	-	-	-	96.0	79.6	99.9	R	36.3	5.4	I
var-344	GUA	83.6	71.9	91.8	-	-	-	-	-	-	-	-

(1) AUIPC: area under the infestation progress curve.

(2) Both names are indicated for cultivars from the same genotype (determined on genotyping basis) with different labels in the two populations, * indicates outlier cultivars in the PCA that were removed from the association study.

(3) Genotype present in the Reunion panel (REU), Guadeloupe panel (GUA) or in both (GUA/REU).

(4) LCL95 and HCL95 = lower and upper exact binomial 95% confidence interval computed by SAS proc Freq.

(5) Virus genotype identified in the cultivar, B: BRA-PER, C: CUB, R: REU, na: no amplification.

(6) SEM = standard error of the mean.

(7) R = aphid resistant cultivar (mean significantly lower than the trial mean, $P < 0.05$). S = aphid susceptible cultivar (mean significantly higher than the trial mean). I = intermediate aphid susceptibility (mean not significantly different of the trial mean).

Supplementary table 2. List of significant markers associated with resistance to SCYLV in the Reunion panel, using correction for panel structure (GLM model) or corrections for structure and kinship (MLM model).

haplotype	HG -CG on R570 map ^a	marker ^b	number of genotyped cultivars	marker frequency	relative effect (%)	GLM			MLM nominal P value	GLM nominal P value in Guadeloupe ^d
						R ²	nominal P value	Signif. permutation ^c		
R172		R-A-540	183	0.58	-155.3	0.08	4.4E-06	***	5.6E-06	-
R133		R-A-154	184	0.11	-510.0	0.04	1.9E-03	*	1.8E-03	-
R160		D-186	147	0.89	118.2	0.05	2.1E-03	*	2.5E-03	6.0E-01
R154		D-1820	151	0.07	-759.5	0.06	6.3E-04	***	6.4E-04	-
R182		D-1326	170	0.29	-248.4	0.04	3.2E-03	*	1.9E-03	5.5E-01
R161		D-556	176	0.90	119.7	0.04	1.7E-03	*	2.2E-03	-
R135		D-1712	177	0.94	112.4	0.05	8.8E-04	***	1.2E-03	8.8E-01
R16	VIII-2	R-A-65	167	0.46	235.1	0.05	1.0E-03	*	2.8E-03	3.6E-01
R16		R-A-863	182	0.39	295.2	0.04	1.4E-03	*	1.9E-03	-
R16		D-1433	175	0.57	270.8	0.04	2.8E-03	*	3.4E-03	-
R16		D-1474	177	0.61	190.9	0.04	2.0E-03	*	2.0E-03	-
R16	VIII-2	D-1275	181	0.58	204.0	0.04	1.4E-03	**	1.4E-03	-
R16	VIII-2	D-1405	180	0.56	225.3	0.04	1.9E-03	*	1.9E-03	-
R19		R-A-903	183	0.30	-287.7	0.04	1.1E-03	**	1.7E-03	-
R19		D-52	172	0.18	-524.4	0.06	1.2E-04	***	1.8E-04	<u>3.3E-03</u>
R19		D-817	183	0.11	-616.4	0.05	3.4E-04	***	4.7E-04	<u>1.8E-03</u>
R19		D-212	184	0.11	-626.2	0.06	2.0E-04	***	3.0E-04	<u>1.8E-03</u>
R36		D-371	182	0.12	-601.6	0.04	2.3E-03	*	3.5E-03	<u>1.4E-02</u>
R13		D-757	180	0.85	122.7	0.04	1.3E-03	*	1.8E-03	9.0E-02
R13		D-1342	181	0.87	119.0	0.04	8.7E-04	***	1.4E-03	<u>7.2E-03</u>
R79		D-1220	175	0.18	-460.1	0.05	6.8E-04	***	1.3E-03	2.3E-01

^a homology group-cosegregation group on R 570 genetic map (<http://tropgenedb.cirad.fr>).

^b Marker names beginning by R-A: AFLP; by D; DArTs

^c***, **, *: significant association with GLM model, respectively at P < 0.001, P < 0.01, P < 0.05, using a permutation test to adjust for experiment-wise type 1 error.

^d underlined bold values correspond to confirmed linkage according to Lander and Kruglyak (1995), i.e. linkage that are significant in Reunion by permutation test and significant at a nominal P < 0.05 in Guadeloupe. Markers not coded in Guadeloupe are signaled by '-'.

Supplementary table 3. List of significant markers associated with resistance to SCYLV in the Guadeloupe panel, using correction for panel structure (GLM model) or corrections for structure and kinship (MLM model).

haplotype	HG -CG on R570 map ^a	marker ^b	number of genotyped cultivars	marker frequency	relative effect (%)	GLM			MLM nominal P value	GLM nominal P value in Reunion ^d
						R ²	nominal P value	Signif. permutation ^c		
G147	I-4	G-A-1137	187	0.16	-632.0	0.06	5.5E-04	***	1.2E-03	-
G168		G-A-1266	176	0.32	-275.7	0.05	1.2E-03	*	2.2E-03	-
G166		G-A-401	115	0.12	-566.9	0.07	1.9E-03	*	5.2E-03	-
G167		G-A-597	174	0.20	-311.2	0.08	1.2E-04	***	4.1E-04	-
G156		G-A-1728	174	0.63	170.1	0.07	2.6E-04	***	9.0E-04	8.7E-01
G148		G-A-98	186	0.18	-456.1	0.08	3.0E-05	***	6.1E-05	-
G129		G-A-232	186	0.11	-837.9	0.06	3.2E-04	***	2.4E-03	-
G10		D-228	187	0.13	-689.7	0.06	3.3E-04	***	6.6E-05	7.1E-02
G11		D-817	188	0.09	-1095.6	0.05	1.8E-03	*	7.0E-03	<u>4.5E-04</u>
G11		D-212	188	0.09	-1095.6	0.05	1.8E-03	*	7.0E-03	<u>2.9E-04</u>
G15		G-A-1093	188	0.15	-582.6	0.05	8.8E-04	***	1.4E-02	-
G15		G-A-693	133	0.29	-366.9	0.08	4.0E-04	***	5.8E-04	-
G20		G-A-1873	161	0.44	-289.1	0.06	1.4E-03	*	9.2E-03	-
G20		G-A-386	163	0.39	-191.9	0.07	2.6E-04	***	5.8E-04	-
G26	I-6	G-A-1758	165	0.23	720.3	0.06	9.2E-04	***	4.0E-03	-
G26		G-A-472	168	0.35	301.7	0.05	1.5E-03	*	6.6E-03	-
G34	VI-2	G-A-1776	187	0.14	-562.4	0.06	4.1E-04	***	1.5E-03	-
G34		D-340	186	0.20	-478.2	0.11	2.1E-06	***	1.1E-05	<u>4.1E-02</u>
G34		D-1363	188	0.07	-1286.5	0.05	1.8E-03	*	1.3E-02	-
G37	VI-2	G-A-513	178	0.11	-852.7	0.07	1.2E-04	***	8.3E-04	-
G37		D-310	187	0.14	-633.0	0.07	8.6E-05	***	6.5E-04	1.2E-01
G37		D-993	188	0.52	-182.7	0.06	7.2E-04	***	2.6E-03	-
G40		G-A-1165	183	0.06	-1516.9	0.08	7.9E-05	***	1.3E-04	-
G41	VIII-1	D-1720	188	0.61	175.0	0.07	1.2E-04	***	7.2E-04	-
G48		D-102	172	0.65	-153.4	0.07	3.0E-04	***	1.2E-03	<u>3.1E-02</u>
G48		D-1737	178	0.62	-162.6	0.05	2.1E-03	*	5.3E-03	<u>4.2E-02</u>
G52		D-299	187	0.07	-1140.7	0.05	1.8E-03	*	3.2E-03	1.2E-01
G52		D-398	187	0.07	-1140.7	0.05	1.8E-03	*	3.2E-03	1.2E-01
G52		D-1757	184	0.08	-1093.1	0.05	1.8E-03	*	2.9E-03	1.2E-01
G70		D-1814	188	0.16	-580.8	0.05	1.9E-03	*	6.8E-03	7.3E-01
G70		D-1056	187	0.14	-667.0	0.05	8.1E-04	***	4.3E-03	7.6E-01
G70		D-190	188	0.15	-567.8	0.05	2.0E-03	*	8.4E-03	7.9E-01

^a Homology group-cosegregation group on R 570 genetic map (<http://tropgenedb.cirad.fr>).

^b Marker names beginning by R-A: AFLP; by D: DArTs

^c***, **, *: significant association with GLM model, respectively at P < 0.001, P < 0.01, P < 0.05, using a permutation test to adjust for experiment-wise type I error.

^d Underlined bold values correspond to confirmed linkage according to Lander and Kruglyak (1995), i.e. linkage that are significant in Guadeloupe by permutation test and significant at a nominal P < 0.05 in Reunion. Markers not coded in reunion are signaled by '- '.

Supplementary table 4. List of significant markers associated with resistance to aphids in the Reunion panel, using correction for panel structure (GLM model) or corrections for structure and kinship (MLM model).

haplotype	HG -CG on R570 map ^a	marker ^b	number of genotyped cultivars	marker frequency	relative effect (%)	GLM			MLM nominal P value
						R ²	nominal P value	Signif. permutation ^c	
R180		R-A-371	176	0.26	-379.5	0.06	1.0E-03	*	4.6E-03
R185		D-945	180	0.84	-117.3	0.06	1.6E-03	*	7.3E-03
R125		D-921	179	0.08	-998.5	0.05	2.3E-03	*	1.8E-02
R122		D-913	154	0.86	-122.6	0.06	1.8E-03	*	7.4E-03
R127		D-735	183	0.89	-113.1	0.07	5.5E-04	***	2.0E-03
R10		R-A-209	176	0.36	-268.8	0.07	6.4E-04	***	9.8E-03
R16		D-1038	125	0.38	241.4	0.07	2.5E-03	*	4.2E-02
R24		D-1072	173	0.29	303.3	0.08	2.8E-04	***	1.6E-03
R27		D-487	182	0.18	-595.4	0.08	1.3E-04	***	6.3E-04
R27		D-1131	181	0.17	-625.8	0.09	7.5E-05	***	3.8E-04
R29		R-A-503	181	0.69	-145.8	0.09	7.2E-05	***	4.6E-04
R29		R-A-868	182	0.60	-165.2	0.07	3.8E-04	***	2.4E-03
R29		D-831	175	0.79	-125.7	0.06	1.8E-03	*	3.4E-03
R30		R-A-602	184	0.43	231.2	0.07	4.8E-04	***	3.6E-03
R36		D-795	182	0.12	-864.5	0.06	1.3E-03	*	6.6E-03
R13		R-A-1260	167	0.37	339.8	0.07	8.8E-04	***	7.2E-03
R13		D-245	175	0.52	188.0	0.09	6.5E-05	***	1.8E-04
R41		D-675	162	0.72	-140.5	0.06	1.3E-03	*	5.2E-03
R41		D-445	167	0.73	-126.1	0.08	3.8E-04	***	1.1E-03
R44		D-475	180	0.47	219.6	0.07	6.2E-04	***	6.4E-03
R44		D-1741	183	0.45	218.2	0.07	4.6E-04	***	4.8E-03
R61		D-1813	180	0.72	-151.0	0.05	2.1E-03	*	1.5E-02
R62		D-581	180	0.11	-869.7	0.06	1.6E-03	*	1.2E-03
R75		D-1796	179	0.85	-114.4	0.08	1.2E-04	***	4.0E-04
R75		D-1582	180	0.86	-114.3	0.07	2.4E-04	***	8.5E-04

^aHomology group-cosegregation group on R 570 genetic map (<http://tropgenedb.cirad.fr>).

^b Marker names beginning by R-A: AFLP; by D; DArTs

^c***, **, *: significant association with GLM model, respectively at $P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$, using a permutation test to adjust for experiment-wise type 1 error.

CHAPITRE II : Mécanismes de résistance à Melanaphis sacchari chez le cultivar R 365

Ils aiment à vivre ensemble, & par grosses troupes. Quelquefois une feuille en est toute chargée, & c'est par le dessous, apparemment parce qu'ils veulent se cacher, ou que cette surface de la feuille est plus fraîche & plus tendre. Alors ils ne sont pas épars confusément & sans ordre sur cette petite plaine, toutes leurs têtes sont tournées vers un centre commun. Quelquefois ils font une large ceinture à une tige qu'ils enveloppent, ayant tous leurs têtes tournées vers un même côté.

René-Antoine Ferchault de Réaumur (1737)

« mémoires pour servir à l'histoire des insectes »

Chapitre 2 : Mécanismes de résistance à

Melanaphis sacchari chez le cultivar

R 365

Le phénotypage au champ réalisé dans le cadre des travaux d'association mapping a permis d'identifier des clones résistants, significativement moins infestés par *Melanaphis sacchari* que la moyenne de l'essai. Parmi ceux-ci, un petit nombre de cultivars a été sélectionné afin de caractériser finement la résistance au laboratoire ; le cultivar R 365, qui était l'un des moins infestés pour les deux années de comptages, a également présenté les résultats les plus probants lors de tests préliminaires (caractérisation sur plantes entières, antixénose avec choix), et son niveau de résistance par antibiose et antixénose a été mesuré par rapport au cultivar témoin, MQ 76/53, qui était le plus infesté dans l'essai au champ. Les deux cultivars sont tous deux indemnes de SCYLV, ce qui a permis d'écarter une potentielle interaction entre l'attractivité de la plante pour le puceron et son statut vis-à-vis du virus.

Deux séries de tests biologiques ont été mis en place : des tests de colonisation, afin de tester la résistance par antixénose sur plantules ; et des tests de performance, afin d'évaluer la résistance par antibiose, en mesurant les 'traits de vie' des pucerons sur des feuilles excisées collectées au champ. Des tests complémentaires d'antibiose ont été réalisés pour une autre espèce de puceron présente sur canne à sucre à la Réunion, *Rhopalosiphum maidis*, qui est également un vecteur du SCYLV. Enfin, des mesures par électro-pénétrographie (EPG) ont été utilisées afin de caractériser finement le comportement alimentaire de *Melanaphis sacchari*, et tenter de déterminer la localisation tissulaire de la résistance variétale.

Les tests de colonisation ont permis de mesurer une réduction significative du nombre de pucerons présents sur les plants 8h après infestation, et un maintien de cette différence entre cultivars jusqu'à 72h après infestation, sans augmentation de cette différence. Les tests de performance ont permis de montrer une baisse du taux de survie larvaire (0.18 pour R 365 contre 0.71 pour MQ 76/53), de la durée pré-reproductive, de la fécondité et de la longévité, pour une réduction totale du r_m (taux d'accroissement intrinsèque) par un facteur 4. La même tendance a été observée chez le puceron *Rhopalosiphum maidis*, avec une valeur de r_m négative sur R 365, semblant indiquer l'impossibilité d'établir une descendance sur ce

cultivar. Les tests de comportement alimentaire ont montré que la résistance portée par R 365 s'exprime à deux niveaux : dans les premières étapes de l'interaction avec le puceron, on observe une augmentation du temps nécessaire à l'établissement du puceron dans le phloème, caractérisé par l'apparition de salivation aqueuse (signal E1) ; une fois le phloème atteint, aucune ingestion passive de sève élaborée (signal E2) n'a été observée chez R 365 durant les 8 heures d'enregistrement, et ce en l'absence de différence pour la durée de salivation dans le phloème (E1).

Ces traits phénotypiques sont des caractéristiques classiques des résistances variétales aux pucerons déjà décrits dans d'autres modèles de plantes cultivées, notamment dans l'identification de gènes majeurs de résistance à l'insecte.

Publication associée :

B. Fartek, S. Nibouche, P. Turpin, L. Costet & B. Reynaud

Mechanism of resistance to *Melanaphis sacchari* in the sugarcane cultivar R 365

Soumis à la revue Entomologia Experimentalis et Applicata

Mechanism of resistance to *Melanaphis sacchari* in the sugarcane cultivar

R 365

B. Fartek^{1,2}, S. Nibouche^{1*}, P. Turpin¹, L. Costet¹ & B. Reynaud¹

¹Cirad, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

²Université de la Réunion, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

*** Correspondence:** Cirad, UMR PVBMT, 7 chemin de l'IRAT, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France ; samuel.nibouche@cirad.fr

Short title:

Resistance of sugarcane cultivar R 365 to *Melanaphis sacchari*

Key words:

Saccharum spp., aphids, antiobiosis, antixenosis, EPG

Abstract

The present study focuses on the resistance of sugarcane (*Saccharum* sp.) to the aphid, *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Hemiptera: Aphididae), which is the main vector of the *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV; genus *Polerovirus*, family Luteoviridae). We characterised a resistance to *M. sacchari* in the sugarcane cultivar R 365, using a three-year field trial and laboratory experiments on potted plantlets and excised leaves, and with the susceptible cultivar MQ 76/53 as a control. Resistance of R 365 to *M. sacchari* reduced aphid populations in the field, involved antixenosis and antibiosis, and proved to be fully active both on intact plant and excised leaves. We demonstrated a delayed salivation in phloem and a strong restriction of passive uptake of phloem sap in R 365, using electronic monitoring of aphid feeding behaviour with the DC-EPG technique. Additionally, this resistance proved to be efficient against *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (Hemiptera: Aphididae), another aphid vector of SCYLV infecting sugarcane in Reunion.

Introduction

Aphids are crop pests that can cause immense damage in a short amount of time notably through their tremendous rate of increase (Kindlmann et al., 2007). Moreover, aphids are the vectors of 28% of known plant viruses (Hogenhout et al., 2008). The present research focuses on the sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Hemiptera: Aphididae), which is the main vector of the *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV; genus *Polerovirus*, family Luteoviridae) (Schenck & Lehrer, 2000), a disease of economical importance in the whole sugarcane growing area (Lehrer & Komor, 2008; Lehrer et al., 2008; McAllister et al., 2008; Lehrer et al., 2009). It has only been a few years since this disease has been described, and interest of sugarcane breeding centres in resistance to the virus and its vectors is recent (Lehrer et al., 2009; Akbar et al., 2010). In Reunion, SCYLV is responsible for heavy yield losses in susceptible cultivars (Rassaby et al., 2003). For circulative insect borne viruses such as SCYLV, resistance to the insect may improve the resistance to the disease (Katis et al., 2007; van Emden, 2007).

Characterisation of sources of resistance to phloem-feeding insects, especially aphids, relies on studies of the phenotypic expression of plant-insect interactions. Prior to a sustainable phloem sap ingestion, aphids have to face a set of physical, chemical or mechanical plant responses under the control of genetic resistance factors (Kaloshian & Walling, 2005; van Emden, 2007). Painter (1951) has grouped resistance factors in three main categories: (i) non preference (reduction of plant acceptance by the pest), later called antixenosis according to Kogan and Ortman (1978), (ii) antibiosis (reduction of pest survival and multiplication) and (iii) tolerance (ability of plant to cope in spite of pest attack); all of which may overlay in the general expression of resistance. Studying plant-aphid interactions after screening pools of genetic resources is an important prerequisite to select the most efficient and durable resistance.

Resistance factors to aphids have been characterised in the past thirty years for several crops, and their genetic control investigated. Aphid resistances, based on polygenic or monogenic control, have been reported. The first monogenic resistance identified was the *Vat* gene that conferred antixenosis and antibiosis to *Aphis gossypii* (Glover) in watermelon (Kishaba et al., 1976; Pitrat & Lecoq, 1980). Later, similar investigations were carried on several aphid-crop models of agricultural importance, reviewed by Dogimont et al. (2010). Among these, detailed works on the effect of a single gene on plant resistance to aphids were led on *Mi* resistance on tomato to *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Kaloshian et al., 2000) and barrel medic *AKR* resistance to *Acyrtosiphon kondoi* Shinji (Klingler et al., 2005). In both cases, resistance implied effect on aphid biology by antixenosis and antibiosis, and depression of phloem feeding. In cereals, several sources of antixenosis and antibiosis resistance to different aphid species have been described: resistance to *Sitobion avenae* F., *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) or *Schizaphis graminum* (Rondani) in wheat (Di Pietro et al., 1998; Berzonsky et al., 2003), resistance to *Sipha flava* (Forbes), *M. sacchari* or *S. graminum* in sorghum (Dixon et al., 1990; Webster, 1990; Singh et al., 2004), resistance to *D. noxia* in barley (Webster et al., 1991), resistance to *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) in maize (Carena & Glogoza, 2004). In sugarcane, only few studies have been carried out on the resistance to aphids. White (1990) has compared six cultivars for their resistance to *S. flava*, detecting antixenosis or antibiosis in some cultivars. Akbar et al. (2010) have screened five commercial cultivars for resistance to *M. sacchari* and *S. flava*, detecting antibiosis in some cultivars but revealing neither antixenosis nor tolerance. To date, no precise plant-insect interactions or effect of plant resistance on aphid feeding behaviour have been described in sugarcane.

In this study, we identified the cultivar sugarcane R 365 as highly resistant to *M. sacchari* during a three year field screening of 184 cultivars. We then characterised the resistance in R 365, using the susceptible cultivar MQ 76/53 as a control. This resistance involved

antixenosis and antibiosis, and proved to be fully active both on intact plant and excised leaves. We demonstrated a suppression of passive uptake of phloem sap in R 365, revealed by electronic monitoring of aphid feeding behaviour using the DC-EPG technique. Additionally, this resistance proved to be efficient against *R. maidis*, another aphid vector of SCYLV infecting sugarcane in Reunion.

Material and Methods

Plant material

The susceptible control used in our study is MQ 76/53, an old Australian cultivar derived from a cross between the old cultivar TROJAN (CO 270 x *Saccharum officinarum*) and SES 528 (a wild *S. spontaneum* clone) (Raboin et al., 2006). The resistant cultivar studied, R 365, is an eRcane (www.ercane.re) cultivar derived from a cross between V114 (POJ 2878 x Uba Marot [*S. sinense*]) and CO 281 (eRcane, unpublished).

Potted plantlets from cultivars R 365 and MQ 76/53 were used for laboratory experiments. They were grown from stem cuttings collected from field. Cuttings were at first put to germinate in humid mops, and transferred in 9x9x9 cm pots filled with potting soil for approximately 2 weeks (25°C, L12:D12), until they reached the 3-leaf state.

Field trial

Comparison of the susceptibility of R 365 and MQ 76/53 to *M. sacchari* was first carried out on a field trial. This trial was designed for a complementary study dealing with the exploration of the genetic variability of sugarcane resistance to *M. sacchari* (unpublished data). 184 sugarcane cultivars from 29 breeding centers around the world were compared in an alpha-lattice design with three replications, 20 blocs per replication and 10 cultivars per bloc. Elementary plots consisted in one 2.5 meter long row. Each elementary plot was

separated from the neighbouring plot by a row planted with the cultivar B 34/104 which is highly susceptible to *M. sacchari*, to reduce interactions between adjacent plots. Plots were 1.5 m spaced. Aphid infestation was evaluated every two weeks, respectively during 14 weeks during the 2007-2008 cropping season, 20 weeks for the 2008-2009 cropping season, and 24 weeks for the 2009-2010 cropping season for a total of 29 counts. At each observation date, for each elementary plot, the lowest green leaf of 20 randomly selected stalks was observed. The percentage of infested leaves was scored. A leaf was recorded as infested when at least one aphid was observed on it.

Survey carried out in the field trial in 2007 and 2009 (unpublished data) using tissue-blot immunoassay (TBIA) (Schenck et al., 1997) on ten leaves from ten stalks randomly sampled in each elementary plot have shown that both R 365 and MQ 76/53 were free of infection by the SCYLV, thus excluding the possibility of interactions between virus infection and aphid performance or behaviour (Ferreles & Moreno, 2009).

Insects

All of the experiments using *Melanaphis sacchari* were carried out with a clonal isofemale lineage set up from a female collected in Saint-Pierre (Reunion) on sugarcane in October 2007. The genotyping of this lineage at ten polymorphic microsatellite loci (Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium et al., 2010) showed that it belongs to the Ms16 multilocus genotype (MLG) (Fartek et al. in prep.). This MLG is the most frequently observed on sugarcane in Reunion. Aphids were reared in glass tubes on excised sugarcane leaves collected in the field from cultivar MQ 76/53, using the method described by Abu Ahmad et al. (2007). The tubes were stored at L12:D12, constant temperature (28°C) and hygrometry (80%).

Rhopalosiphum maidis laboratory strain was a clonal isofemale lineage set up from a single individual collected from maize (*Zea mays*) in Saint-Paul (Reunion) and maintained on sorghum (*Sorghum bicolor*) young plantlets. Rearing condition were 24°C, 90% RH, L12:D12.

Aphid development on potted plantlets

The development of *M. sacchari* was first studied on potted plantlets in a no-choice trial. Ten apterous larvae, aged 3-4 days (i.e. approximately L2-L3), were placed on each plantlet with a camel hair brush, and the number of aphids on plants was scored at 3 and 10 days after infestation. Each cultivar was isolated from the others by placing potted plantlets on a tray that was put on four supporting and water-immersed legs. This experimental design allowed aphids to move from plant to plant within a same cultivar, but not from one cultivar to another. Three replications were carried out, each using 10 plantlets per cultivar. Experiments were carried out in climatic chambers (25°C, L12:D12).

Settling behaviour experiments on potted plantlets

Settling behaviour under no-choice conditions were carried out on potted plantlets to demonstrate antixenosis in R 365. Experimental design was similar to aphid development experiments, except that the number of aphids remaining on plants was scored at 8, 24, 48 and 72 hours after infestation. Newly born nymphs were not recorded when present. Three replications were carried out, each using 10 to 15 plantlets per cultivar.

Aphid life traits experiments on excised leaves

Experiments were carried out to compare aphid development and life traits on MQ 76/53 and R 365 using excised leaves. Leaf cuts of approximately 1 x 2cm were placed in Petri dishes,

filled with 10 ml of a semi-liquid solution of 0.1% agarose. Leaf cuts were placed at the surface of the agarose, with abaxial surface upward. This method avoided dehydration of the leaves and prevented aphids to escape from the leaf cuts. Tests were no-choice experiments; each Petri dish contained a leaf cut from a sole cultivar. Each replication of a single condition included twenty Petri dishes, each dish containing a leaf cut collected on a separate stalk.

Aphid life traits were evaluated as follows. An apterous adult was placed on the leaf cut and allowed to reproduce for 24h, and was removed at day one (D1) when at least one larva had been laid. The number of first generation (F1) larvae laid at D1 was scored. At day three (D3), the number of surviving F1 larvae was scored. One of the surviving larvae was left on the leaf, and surveyed every day until its death. The following life traits were measured: the early larval survival rate (ratio between live larvae at D3 and larvae laid at D1); the late larval survival rate (ratio of larvae surviving from D3 up to adult stage); pre-reproductive period (duration between birth and adult stage, set as the first day when aphid had reproduced); fecundity (number of F2 larvae laid by the F1 adult); and longevity of F1 individuals.

A first experiment, repeated four times, used *M. sacchari* aphids from the laboratory strain, as to evaluate the effect of R 365 resistance on aphid life traits. In a second experiment, repeated six times, the resistance of R 365 was tested towards *R. maidis*. All experiments were carried out by comparing R 365 and MQ 76/53.

Feeding behaviour on potted planlets

The Electrical Penetration Graph (DC-EPG) technique (Tjallingii, 1985a) was used to monitor the effect of R 365 resistance on the feeding behaviour of *M. sacchari*. The EPG equipment was housed in an air conditioned room (25 +/- 2 °C) and insulated from electrical noise by a Faraday cage. The DC amplifier used was an EPG Giga-8 system (Wageningen Agricultural University, The Netherlands), linked with a Analog-to-digital (A-D) board (NI DAQPad

6016, National Instrument, Austin, TX, USA) to an Intel Pentium 4 microcomputer running a new version of EPG-SOFT (Reynaud et al., 2002) for acquiring and processing data. The EPG signals were acquired at a 100 Hz sampling frequency, stored on the hard disk and simultaneously displayed on a screen every 5s-time interval.

Five-day old nymphs were tethered to a 20 μ m-diameter gold wire (Heraeus Materials Technology, Germany) with conductive silver glue (25g PELCO® Colloidal Silver Paste + 25ml PELCO® SEM-Gold/Silver Extender, Ted Pella Inc., Redding, CA, USA) and allowed to feed on 2-week old plantlets for 8-hour EPG recordings. Plantlets were grown as previously described.

EPG recordings were at first analysed with EPG-SOFT. The software classified the EPG signals successively by 512 point sequence in one of the classical DC-EPG waveform described for aphids (Tjallingii, 1985b; Tjallingii, 1990; Reese et al., 2000): (i) pathway phase, including four pooled pathway waveforms/activities (Alvarez et al., 2006), i.e. waveforms A (stylet contact with leaf surface), B (intercellular sheath salivation), C (general stylet activities in mesophyll), and potential drops (intracellular puncture); (ii) xylem phase including waveform G (active ingestion); (iii) waveform F, mechanical stylet work (penetration problems); (iv) Phloem phase including waveform E1, watery salivation in phloem tissues and waveform E2: passive phloem sap ingestion; and (v) NP: non probing. The results of automated EPG waveform recognition were controlled visually and the classification modified when necessary.

Statistical analysis

Aphid scoring data from the field trial were analyzed as annual cumulated percentages of infested leaves. The three annual cumulated percentages were considered as longitudinal repeated data, as observations were carried out during three years on the same elementary

plots, thus potentially generating correlation of residuals across years. Data were therefore subjected to an analysis of variance using a generalized mixed model with SAS procedure Glimmix (SAS Institute, 2008), where replication and year effect were considered fixed and all other effects (cultivar, cultivar x year, bloc, elementary plot) were considered random. Significance of the difference between R 365 and MQ 76/53 was tested by a contrast analysis with a Student t-test.

Data from aphid development and settling behaviour experiments were count data, and were therefore submitted to a two-way ANOVA (cultivar and replication effects) using a generalized model (Poisson regression) with SAS procedure Genmod. Analysis was performed considering each observation date separately. A correction for overdispersion of data was used, the usual chi-squared test statistic was therefore replaced by the F statistic.

Data from aphid life traits experiments were submitted to two-way ANOVAs testing cultivar and replication effects. Larval mortality rates were analysed by SAS procedure Genmod with a logistic model. Pre-reproductive period, longevity and fecundity were analysed by a general linear model with SAS procedure Glm. The intrinsic rate of increase r_m (number of females produced per female per day) was computed according to Birch (1948) formula. Intrinsic rate of increase was computed by pooling all individuals among the replications of each test. Standard errors of r_m were estimated with the Jackknife method (Meyer et al., 1986).

Raw data files of EPG recording were analyzed by taking into account all files where no anomaly had been encountered (death or de-tethering of the insect); EPG recordings where only pathway phases or non-probing were observed during the 8 hours were therefore included in the analysis. EPG parameters submitted to analyze were (i) the proportions of aphids exhibiting at least one of each waveform during the 8 hour record, (ii) the proportions of aphids exhibiting at least one E1 waveform within 1, 2, 3, 4 or >4 hours after the first penetration, (iii) the time to first penetration from start of recording, and (iv) the total duration

of each waveform. Proportions were analysed by Fisher's exact test with SAS procedure Freq. Total durations of waveforms were analyzed with Kruskal & Wallis non parametric test with SAS procedure Npar1way, as non-normality of residuals prevented the use of a general linear model.

Results

Field trial

In the field trial, the aphid infestation means of R 365 and MQ 76/53 were respectively significantly lower ($t = 2.95$; 1,012 df; $P = 0.0033$) and higher ($t = 6.70$; 1,012 df; $P < 0.0001$) than the trial mean. The level of infestation (Figure 1) was highly significantly different between these two cultivars ($t = 6.10$; 1,012 df; $P < 0.0001$).

Aphid development on potted plantlets

The evolution of aphid populations on potted plantlets infested by 10 larvae revealed a strong contrast between both cultivars (Figure 2). On R 365, the number of aphids per plantlets decreased by a two-fold factor before 72h and remained stable thereafter. On MQ 76/53, the number of aphids per plantlets increased by a 1.5-fold factor before 72h and by a 2.5-fold factor between 72h and 240h. The number of aphids per plants was significantly different between cultivars, both at 72h ($F_{1, 56} = 61.3$; $P < 0.0001$) and at 240h ($F_{1, 56} = 127.9$; $P < 0.0001$).

Settling behaviour experiments on potted plantlets

Settling of aphids on R 365 was found to be significantly lower than on MQ 76/53 plantlets, indicating an antixenosis effect that began less than 8 hours after aphid deposit (Figure 3). From 24h to 72h, the decrease of aphid populations appeared to be similar on both cultivars.

The mean number of aphids per plantlet was significantly lower on R 365 than on MQ 76/53 at 8 hours ($F_{1,68} = 14.17$, $P = 0.0004$), 24h ($F_{1,66} = 33.89$, $P < 0.0001$), 48h ($F_{1,66} = 29.79$, $P < 0.0001$) and 72h ($F_{1,66} = 32.83$, $P < 0.0001$) post-inoculation.

Aphid life traits experiments on excised leaves

The first life trait experiment (Table1) revealed a reduction of *M. sacchari* life traits on cultivar R 365. Significant differences were found between the two cultivars (R 365 and MQ 76/53) for all measured life traits. The global larval survival, i.e. the number of larvae laid at D1 and reaching adulthood (computed as the product of early and late survival rates), was 19% on cultivar R 365, contrasting with 71% on MQ 76/53. Pre-reproductive period was one day longer on R 365, and total fecundity was lowered by 80% on this cultivar. Longevity was reduced by 60% on R 365. Intrinsic rate of increase was reduced by 71% on R 365.

Results from the second experiment revealed that R 365 resistance was efficient against *R. maidis* (Table 2). Trends similar to those observed on *M. sacchari* were measured between the cultivars. Longevity and fecundity were significantly lower on R 365. Larval survival rates were not significantly different, though the global larval survival rate (from first instar to adulthood) was lowered by 75% on R 365 (7% on R 365 vs. 28% on MQ 76/53). Pre-reproductive periods were not significantly different. The intrinsic rate of increase r_m was found to be negative on R 365, suggesting that *R. maidis* is not able to develop successfully on this cultivar.

Feeding behaviour on potted plantlets

Aphid feeding behaviour was greatly impaired on R 365 with delayed phloem watery salivation (E1 waveform) (Figure 4) and total absence of passive phloem ingestion (E2 waveform) within the eight hours of recording (Table 3).

Mean time to first penetration from the beginning of the recording was 30.9 ± 11.0 min in R 365 and 28.2 ± 10.3 min in MQ 76/53. These values were not significantly different (Kruskal-Wallis test: chi-squared = 0.1322, df = 1, P = 0.7162).

We observed an increased delay for aphids to reach the phloem from first penetration on R 365 (Figure 4). This was materialized by a significantly lower proportion of aphids exhibiting at least one E1 waveform at 1 hour (P = 0.0067), 2 hours (P = 0.0176) and 3 hours (P = 0.0354) after first penetration. From the 4th hour after the first penetration, the proportion difference became not significant (P = 0.0750 at 4 hours and P = 0.1464 after 4 hours).

None of the aphids showed any E2 waveform on R 365, as compared to a proportion \pm SD of 64.7 ± 11.6 % in the control. No significant differences were found for total duration and aphid percentages for all other waveforms (Table 3).

Discussion

We have demonstrated that resistance to *Melanaphis sacchari* in sugarcane cultivar R 365 is expressed as antixenosis and antibiosis. The expression of R 365 resistance has a strong effect on feeding behaviour in two ways: (i) it increases the time for aphids to salivate in the phloem, and (ii) it prevents sustained phloem sap ingestion in the first hours of settling on plant. This resistance had a significant effect in field conditions.

The antixenosis exhibited in R 365 reduced the settling of *M. sacchari* by 1.9-fold at 72h, while the antibiosis reduced the intrinsic rate of increase r_m by 3.5-fold. On *Rhopalosiphum maidis*, R 365 had a stronger antibiosis effect that produced a negative value of r_m . Published data on resistance of sugarcane to aphids are rare. Akbar et al. (2010) have compared five commercial sugarcane cultivars. They measured a 2.8-fold and 1.8-fold reduction of r_m on *M. sacchari* and *S. flava* respectively, in the sugarcane cultivar HoCP 91-555 as compared to the susceptible cultivar L 97-128. In their study, antixenosis tests revealed no preference among

cultivars for both aphid species. In a previous study on resistance of six sugarcane cultivars to *S. flava*, White (1990) detected antixenosis in three cultivars, with a 10-fold preference range in a choice-test, while antibiosis was expressed in one cultivar only.

The resistance to *M. sacchari* exhibited by R 365 does not confer total resistance to aphid infestations and appears intermediate when compared to some resistance sources identified in other poaceous crops. For example, Di Pietro et al. (1998) observed a 13-fold factor reduction of the intrinsic rate of increase of *S. avenae* on a diploid wheat accession when comparing to a modern susceptible cultivar. Similarly, Lazzari et al. (2009) showed that the resistance gene *Dn7* produced a 65-fold decrease of fecundity and a negative r_m in *D. noxia* biotype 2 on wheat. Contrastingly, Webster et al. (1991) observed that the eight most resistant accessions among a 524 worldwide barley line collection caused a small reduction of the fecundity of *D. noxia* biotype 1, by a maximal two-fold factor.

Some studies have demonstrated that partial resistance to a virus transmitted by the circulative mode may result from resistance to the insect vector. Such influence has previously been reported on *Triticum monococcum* TM 44 line resistant to *S. avenae* showing reduced BYDV-PAV transmission (Tanguy & Dedryver, 2009). Delatte et al. (2006) showed that the quantitative resistance to the *Tomato yellow leaf curl virus* in a *Lycopersicon pimpinellifolium* accession was caused by a resistance to the whitefly vector *Bemisia tabaci*. Similarly, Dintinger et al. (2005) demonstrated that resistance of some maize lines to *Maize stripe virus* and *Maize mosaic virus* resulted from a resistance to the planthopper vector *Peregrinus maidis*. It is noticeable that in our surveys R 365 appeared free from SCYLV contamination. However, strong resistance factors to SCYLV have been observed in sugarcane germplasm, independently of insect resistance (unpublished data). At the current state of knowledge, it is not possible to know whether R 365 resistance to the yellow leaf disease results from insect

resistance alone, or whether R 365 bears simultaneously independent insect and virus resistance factors.

Specificity of resistance towards closely related aphid biotypes is a critical factor to consider in long-term scale strategies of pest control. Variability of the response among clonal lineages of aphids to resistant cultivars has been demonstrated (Caillaud et al., 1995b; Lombaert et al., 2009). Most aphid resistances are specific to a single aphid species, or to a few biotypes within a species (Dogimont et al., 2010). Breakdowns of major aphid resistance genes have occurred in cereals with *D. noxia* and *S. graminum* (Burd & Porter, 2006; Murugan et al., 2010). Our results indicate that the resistance carried by R 365 is not specific to *M. sacchari* but is also responsible for resistance to *R. maidis*. The *Mi-1* gene, involved in resistance to the root-knot nematode (Milligan et al., 1998), also confers resistance to the potato aphid *M. euphorbiae* (Kaloshian et al., 1997; Rossi et al., 1998) and to the whitefly *B. tabaci* (Nombela et al., 2003). Despite its activity against three very different organisms, Rossi et al. (1998) demonstrated that the resistance to *M. euphorbiae* was specific to aphid biotype. These results underline that the inter-species spectrum of resistance in R 365 does not exclude the existence of an intra-species variability of the response of *M. sacchari*. The clonal lineage used in our study is the Ms16 microsatellite multilocus genotype. Several other *M. sacchari* genotypes are observed on sugarcane (Fartek et al. in prep), and confrontation of resistance in R 365 to the genotypic diversity of *M. sacchari* will be the next step of our work.

Results from EPG studies revealed that R 365 exhibited phloem located resistance factors. The reduction of sustained phloem sap ingestion (E2), generally a few minutes among hours of recording, is the most typical feature of plant resistance to aphids (Tjallingii, 2006), and is observed in most of EPG studies on plant resistance to aphids (Caillaud et al., 1995a; Kaloshian et al., 2000; Klingler et al., 2005). Remarkably, the total absence of sustained phloem sap ingestion (E2 waveform) in 8 hours of EPG recording, as we observed on R 365,

seems quite unusual. To our knowledge, only Marchetti et al. (2009) have experienced such drastic effects on phloem feeding when studying the resistance of apple to the rosy apple aphid *Dysaphis plantaginea* (Passerini). In R 365 we also observed no delay in time to first penetration, but a delayed apparition of E1 waveform. This reduction in time to phloem watery salivation was previously observed on wheat lines resistant to *S. avenae* (Caillaud et al., 1995a), on melon lines bearing the *Vat* gene (Chen et al., 1997; Garzo et al., 2002), or on *Solanum* species resistant to *Myzus persicae* (Sulzer) (Alvarez et al., 2006).

Taken together, our results provide a preliminary insight in the field of aphid resistance in sugarcane. Future research will permit us to gain further insights in the long-term efficiency and durability of R 365 resistance, which remain to be studied. The strong effects observed on aphid biology, resulting in low infestations in field, emphasize the need for further research, especially in the genetic control of resistance and characterisation of the reduction of SCYLV incidence.

Acknowledgements

We thank M. Grondin, C. Lallemand and R. Tibère for technical assistance. This work was funded by the European Union: European regional development fund (ERDF), by the Conseil Régional de La Réunion and by the CIRAD.

References

- Abu Ahmad Y, Costet L, Daugrois J-H, Nibouche S, Letourmy P, Girard J-C & Rott P (2007) Variation in infection capacity and in virulence exists between genotypes of *Sugarcane yellow leaf virus*. *Plant Disease* 91: 253-259.
- Akbar W, Showler AT, Reagan TE & White WH (2010) Categorizing sugarcane cultivar resistance to the sugarcane aphid and yellow sugarcane aphid (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 103: 1431-1437.
- Alvarez A, Tjallingii W, Garzo E, Vleeshouwers V, Dicke M & Vosman B (2006) Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 121: 145-157.
- Berzonsky WA, Ding H, Haley SD, Harris M, Lamb RJ & Mc Kenzie R (2003) Breeding wheat for resistance to insects. *Plant Breeding Reviews* 22 221-296.
- Birch LC (1948) The intrinsic rate of natural increase of an aphid population. *Journal of Animal Ecology* 17: 15-26.
- Burd JD & Porter DR (2006) Biotypic diversity in greenbug (Hemiptera: Aphididae): characterizing new virulence and host associations. *Journal of Economic Entomology* 99: 959-965.
- Caillaud C, Pierre J, Chaubet B & Di Pietro J (1995a) Analysis of wheat resistance to the cereal aphid *Sitobion avenae* using electrical penetration graphs and flow charts combined with correspondence analysis. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 75: 9-18.
- Caillaud CM, Dedryver CA, Di Pietro JP, Simon JC, Fima F & Chaubet B (1995b) Clonal variability in the response of *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae) to resistant and susceptible wheat. *Bulletin of Entomological Research* 85: 189-195.
- Carena MJ & Glogoza P (2004) Resistance of maize to the corn leaf aphid: A review. *Maydica* 49: 241-254.

- Chen JQ, Rahbé Y, Delobel B, Sauvion N, Guillaud J & Febvay G (1997) Melon resistance to the aphid *Aphis gossypii*: behavioural analysis and chemical correlations with nitrogenous compounds. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 85: 33-44.
- Delatte H, Holota H, Reynaud B & Dintinger J (2006) Characterisation of a quantitative resistance to vector transmission of *Tomato yellow leaf curl virus* in *Lycopersicon pimpinellifolium*. *European Journal of Plant Pathology* 114: 245-253.
- Di Pietro JP, Caillaud CM, Chaubet B, Pierre JS & Trottet M (1998) Variation in resistance to the grain aphid, *Sitobion avenae* (Sternorhynca: Aphididae), among diploid wheat genotypes: Multivariate analysis of agronomic data. *Plant breeding* 117: 407-412.
- Dintinger J, Boissot N, Chiroleu F, Hamon P & Reynaud B (2005) Evaluation of maize inbreds for *Maize stripe virus* and *Maize mosaic virus* resistance: disease progress in relation to time and the cumulative number of planthoppers. *Phytopathology* 95: 600-607.
- Dixon OAG, Bramel-Cox PJ, Reese JC & Harvep TL (1990) Mechanisms of resistance and their interactions in twelve sources of resistance to biotype E Greenbug (Homoptera: Aphididae) in sorghum. *Journal of Economic Entomology* 83: 234-240.
- Dogimont C, Bendahmane A, Chovelon V & Boissot N (2010) Host plant resistance to aphids in cultivated crops: Genetic and molecular bases, and interactions with aphid populations. *Comptes Rendus Biologies* 333: 566-573.
- Fereres A & Moreno A (2009) Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Research* 141: 158-168.
- Garzo E, Soria C, Gómez-Guillamón M & Fereres A (2002) Feeding behavior of *Aphis gossypii* on resistant accessions of different melon genotypes (*Cucumis melo*). *Phytoparasitica* 30: 129-140.

- Hogenhout SA, Ammar ED, Whitfield AE & Redinbaugh MG (2008) Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annual Review of Phytopathology* 46: 327-359.
- Kaloshian I, Kinsey MG, Ullman DE & Williamson VM (1997) The impact of *Meu1*-mediated resistance in tomato on longevity, fecundity and behavior of the potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83: 181-187.
- Kaloshian I, Kinsey MG, Williamson VM & Ullman DE (2000) Mi-mediated resistance against the Potato Aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae) limits sieve element ingestion. *Environmental Entomology* 29: 690-695.
- Kaloshian I & Walling LL (2005) Hemipterans as plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 491-521.
- Katis N, Tsitsipis J, Stevens M & Powell G (2007) Transmission of plant viruses: Aphids as crop pests (ed. by H van Emden & R Harrington) CAB International, Wallingford, UK, pp. 353-390.
- Kindlmann P, Jarošík V & Dixon A (2007) Population dynamics: Aphids as crop pests (ed. by H Emden & R Harrington) CABI, London, UK, pp. 311-329.
- Kishaba AN, Bohn GW & Toba HH (1976) Genetic aspects of antibiosis to *Aphis gossypii* in *Cucumis melo* from India. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101: 557-561.
- Klingler J, Creasy R, Gao L, Nair RM, Calix AS, Jacob HS, Edwards OR & Singh KB (2005) Aphid resistance in *Medicago truncatula* involves antixenosis and phloem-specific, inducible antibiosis, and maps to a single locus flanked by NBS-LRR resistance gene analogs. *Plant Physiology* 137: 1445-1455.

- Kogan M & Ortman EF (1978) Antixenosis - A new term proposed to define Painter's "nonpreference" modality of resistance. *Bulletin of the Entomological Society of America* 24: 175-176.
- Lazzari S, Starkey S, Reese J, Ray-Chandler A, McCubrey R & Smith CM (2009) Feeding behavior of Russian Wheat Aphid (Hemiptera: Aphididae) biotype 2 in response to wheat genotypes exhibiting antibiosis and tolerance resistance. *Journal of Economic Entomology* 102: 1291-1300.
- Lehrer A & Komor E (2008) Symptom expression of yellow leaf disease in sugarcane cultivars with different degrees of infection by *Sugarcane yellow leaf virus*. *Plant Pathology* 57: 178-189.
- Lehrer A, Kusalwong A & Komor E (2008) High incidence of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) in sugar plantations and germplasm collections in Thailand. *Australasian Plant Disease Notes* 3: 89-92.
- Lehrer A, Wu K & Komor E (2009) Impact of *Sugarcane yellow leaf virus* on growth and sugar yield of sugarcane. *Journal of General Plant Pathology* 75: 288-296.
- Lombaert E, Carletto J, Piotte C, Fauvergue X, Lecoq H, Vanlerberghe-Masutti F & Lapchin L (2009) Response of the melon aphid, *Aphis gossypii*, to host-plant resistance: evidence for high adaptive potential despite low genetic variability. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 133: 46-56.
- Marchetti E, Civolani S, Leis M, Chicca M, Tjallingii WF, Pasqualini E & Baroni P (2009) Tissue location of resistance in apple to the rosy apple aphid established by electrical penetration graphs. *Bulletin of Insectology* 62 203-208.
- McAllister CD, Hoy JW & Reagan TE (2008) Temporal increase and spatial distribution of Sugarcane Yellow Leaf and infestations of the aphid vector, *Melanaphis sacchari*. *Plant Disease* 92: 607-615.

- Meyer JS, Ingersoll CG, McDonald LL & Boyce MS (1986) Estimating uncertainty in population growth rates: jackknife vs. bootstrap techniques. *Ecology* 67: 1156-1166.
- Milligan SB, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P & Williamson VM (1998) The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10: 1307-1319.
- Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, Andris M, Aradottir GI, Arnau G, Audzijonyte A, Bess EC, Bonadonna F, Bourdel G, Bried J, Bugbee GJ, Burger PA, Chair H, Charruau PC, Ciampi AY, Costet L, DeBarro PJ, Delatte H, Dubois MP, Eldridge MDB, England PR, Enkhbileg D, Fartek B, Gardner MG, Gray KA, Gunasekera RM, Hanley SJ, Havil N, Hereward JP, Hirase S, Hong Y, Jarne P, Jianfei Q, Johnson RN, Kanno M, Kijima A, Kim HC, Kim KS, Kim WJ, LaRue E, Lee JW, Lee JH, Li C, Liao M, Lo N, Lowe AJ, Malausa T, Malé PJG, Marko MD, Martin JF, Messing R, Miller KJ, Min BW, Myeong JI, Nibouche S, Noack AE, Noh JK, Orivel J, Park CJ, Petro D, Prapayotin-Riveros K, Quilichini A, Reynaud B, Riginos C, Risterucci AM, Rose HA, Sampaio I, Silbermayr K, Silva MB, Tero N, Thum RA, Vinson CC, Vorsino A, Vossbrinck CR, Walzer C, White JC, Wieczorek A & Wright M (2010) Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 June 2010 – 31 July 2010. *Molecular Ecology Resources* 10: 1106-1108.
- Murugan M, Khan SA, Cardona PS, Orozco GV, Viswanathan P, Reese J, Starkey S & Smith CM (2010) Variation of resistance in barley against biotypes 1 and 2 of the Russian Wheat Aphid (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 103: 938-948.
- Nombela G, Williamson VM & Muñoz M (2003) The Root-Knot Nematode resistance gene *Mi-1.2* of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 645-649.

- Painter RH (1951) Insect resistance in crop plants. University of Kansas Press, Lawrence, KS, USA.
- Pitrat M & Lecoq H (1980) Inheritance of resistance to Cucumber Mosaic Virus transmission by *Aphis gossypii* in *Cucumis melo*. *Phytopathology* 72: 958-961.
- Raboin L, Oliveira K, Lecunff L, Telismart H, Roques D, Butterfield M, Hoarau J & D'Hont A (2006) Genetic mapping in sugarcane, a high polyploid, using bi-parental progeny: identification of a gene controlling stalk colour and a new rust resistance gene. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1382-1391.
- Rassaby L, Girard JC, Letourmy P, Chaume J, Irey MS, Lockhart BEL, Kodja H & Rott P (2003) Impact of *Sugarcane yellow leaf virus* on sugarcane yield and juice quality in Réunion Island. *European Journal of Plant Pathology* 109: 459-466.
- Reese JC, Tjallingii W, Van Helden M & Prado E (2000) Waveform comparisons among AC and DC electronic monitoring systems for aphid (Homoptera: Aphididae) feeding behavior: Principles and Applications of Electronic Monitoring and Other Techniques in the Study of Homopteran Feeding Behaviour (ed. by GP Walker & EA Backus) Thomas Say Publications in Entomology, Lanham, MD, pp. 70–101.
- Reynaud B, Turpin P & Molinaro F (2002) EPG-SOFT Software.
IDDN.FR.001.420018.S.P.2002.000.20700: Cirad & Université de la Réunion, Saint-Pierre, France.
- Rossi M, Goggin FL, Milligan SB, Kaloshian I, Ullman DE & Williamson VM (1998) The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9750-9754.
- SAS Institute (2008) SAS OnlineDoc® 9.2. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

- Schenck S, Hu JS & Lockhart BE (1997) Use of a tissue blot immunoassay to determine the distribution of *Sugarcane yellow leaf virus* in Hawaii. *Sugar Cane* 4: 5-8.
- Schenck S & Lehrer AT (2000) Factors affecting the transmission and spread of *Sugarcane yellow leaf virus*. *Plant Disease* 84: 1085-1088.
- Singh BU, Padmaja PG & Seetharama N (2004) Biology and management of the sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Homoptera: Aphididae), in sorghum: a review. *Crop Protection* 23: 739-755.
- Tanguy S & Dedryver CA (2009) Reduced BYDV–PAV transmission by the grain aphid in a *Triticum monococcum* line. *European Journal of Plant Pathology* 123: 281-289.
- Tjallingii W (1990) Continuous recording of stylet penetration activities by aphids: Aphid-plant genotype interactions. (ed. by RK Campbell & RD Eikenbary) Elsevier, Amsterdam, pp. 89–99.
- Tjallingii WF (1985a) Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 38: 177-186.
- Tjallingii WF (1985b) Membrane potentials as an indication for plant cell penetration by aphid stylets. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 38: 187-193.
- Tjallingii WF (2006) Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *Journal of Experimental Botany* 57: 739-745.
- van Emden H (2007) Host-plant resistance: Aphids as crop pests (ed. by H van Emden & R Harrington) CAB International, Wallingford, UK, pp. 447-468.
- Webster J (1990) Yellow Sugarcane Aphid (Homoptera: Aphididae): detection and mechanisms of resistance among Ethiopian sorghum lines. *Journal of Economic Entomology* 83: 1053-1057.

- Webster JA, Baker CA & Porter DR (1991) Detection and mechanisms of Russian Wheat Aphid (Homoptera: Aphididae) resistance in barley. *Journal of Economic Entomology* 84: 669-673.
- White WH (1990) Yellow Sugarcane Aphid (Homoptera: Aphididae) resistance mechanisms in selected sugarcane cultivars. *Journal of Economic Entomology* 83: 2111-2114.

Table 1: Life traits and intrinsic rate of increase (mean \pm SEM) of *M. sacchari* on excised leaves from resistant cultivar R 365 and susceptible

MQ 76/53.

cultivar	early-instar larval		late-instar larval		pre	fecundity		longevity	intrinsic rate of	
	survival (%) ^a		survival ^b		reproductive	(larvae / ♀)	(day)	increase	r_m	(♀/♀/day) ^c
R 365	59.4 \pm 3.7 (180)		32.3 \pm 5.9 (65)		10.7 \pm 0.3	12.5 \pm 2.3	10.8 \pm 0.8	0.058 \pm 0.020		
MQ 76/53	88.8 \pm 2.0 (250)		80.5 \pm 3.6 (78)		9.7 \pm 0.2	21.9 \pm 1.9	17.8 \pm 0.6	0.206 \pm 0.006		
F	39.08		70.08		7.33	7.10	49.44			
df	1, 147		1, 3		1, 85	1, 85	1, 138			
P	< 0.0001		<.0001		0.0082	0.0092	< 0.0001			

^a survival from D1 to D3, number of live aphids at D1 under brackets

^b survival from D3 to adult, number of live aphids at D3 under brackets

^c SD estimate of intrinsic rate of increase with Jackknife method

Table 2: Life traits and intrinsic rate of increase (mean \pm SEM) of *Rhopalosiphum maidis* on excised leaves from resistant cultivar R 365 and susceptible MQ 76/53.

11

cultivar	early-instar		late-instar larval		pre reproductive		total		longevity		intrinsic rate of increase	
	larval survival	survival ^b	survival ^b	(%)	period	(day)	fecundity	(larvae / ♀)	(day)	(r _m)	(♀/♀/day) ^c	
R 365	38.1 \pm 4.2 (134)	19.2 \pm 5.8 (45)	5.8 \pm 2.3	9.2 \pm 0.6	6.9 \pm 1.9	- 0.094 \pm 0.058						
MQ 76/53	51.1 \pm 4.2 (139)	54.8 \pm 6.4 (46)	14.0 \pm 1.9	8.0 \pm 0.3	10.7 \pm 1.5	0.140 \pm 0.017						
F	2.64	7.59	9.80	3.75	20.69							
df	1, 129	1, 2	1, 31	1, 31	1, 87							
P	0.1069	0.1103	0.0038	0.0619	< 0.0001							

^a survival from D1 to D3, number of live aphids at D1 under brackets

^b survival from D3 to adult, number of live aphids at D3 under brackets

^c SD estimate with Jackknife method

12

13

14

Table 3: Aphid feeding activities on two sugarcane cultivars measured using Electrical Penetration Graph (EPG) during 8 hours: proportion \pm SD

of aphids exhibiting at least one of each waveform, mean \pm SEM total duration for each waveform.

	Waveform or phase ^c	R 365	MQ 76/53	P
Number of aphids		18	17	
% of aphids exhibiting at least one waveform ^a	E1	55.6 \pm 11.7	82.3 \pm 9.2	0.1464
	E2	0.00	64.7 \pm 11.6	< 0.001
	G	66.7 \pm 11.1	47.1 \pm 12.1	0.3145
	F	50.0 \pm 11.8	52.9 \pm 12.1	1.0000
mean cumulated duration (min) ^b	Non-probing	186.4 \pm 43	89.7 \pm 26.4	0.1290
	Pathway ^c	136 \pm 22.7	134.1 \pm 18.8	0.9737
	G	78.3 \pm 24.2	47.2 \pm 21.3	0.2713
	F	24.8 \pm 8	31.4 \pm 13.3	0.9720
	E1	54.5 \pm 18.3	76.3 \pm 12.9	0.0937
	E2	0 \pm 0	101.3 \pm 29	<.0001

^a statistical analysis with Fisher's exact test.

^b statistical analysis with Kruskal and Wallis test

^c Pathway = phase including waveform A, B, C and potential drops; wave G: xylem active feeding; wave F: mechanical stylet work; wave E1:

watery salivation in phloem; wave E2: passive phloem sap ingestion.

Figure 1: Mean cumulated proportion (\pm SD) of leaves infested by *M. sacchari*, scored from field trial during 29 bi-monthly counts during three cropping seasons on the resistant R 365 and the susceptible MQ 76/53 cultivars. Mean were highly significantly different between both cultivars ($P < 0.0001$).

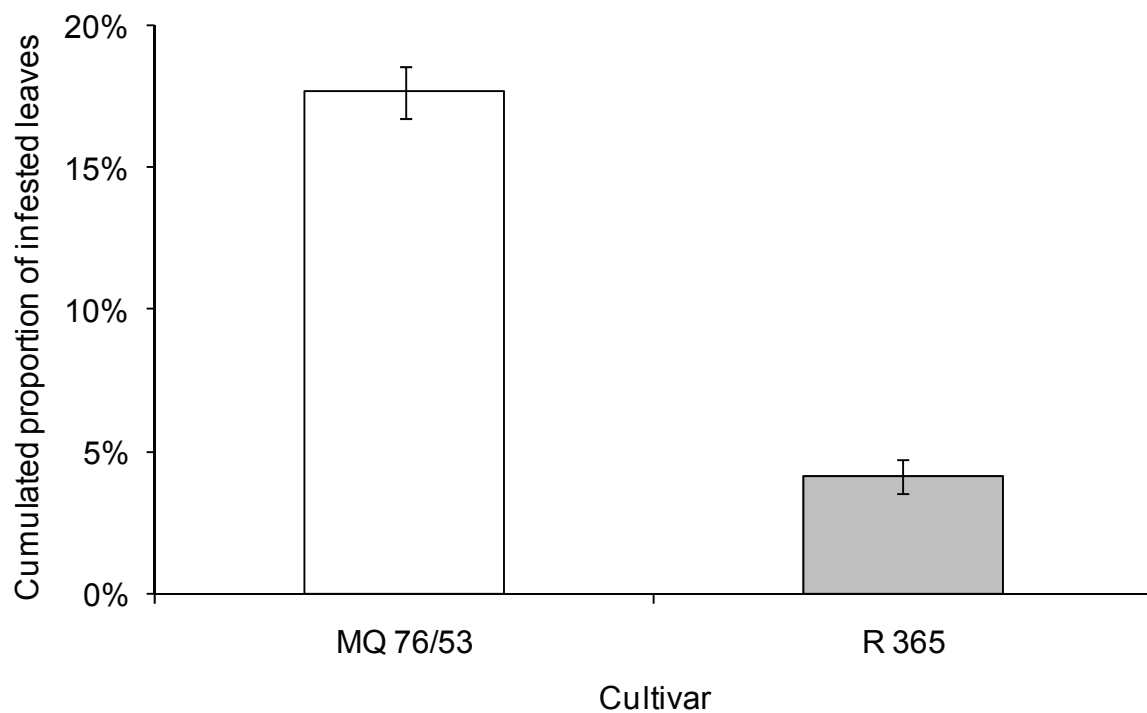


Figure 2: Evolution of the number (mean \pm SEM) of aphids on three week-old potted plantlets infested with 10 L2-L3 *M. sacchari* larvae (white bars = susceptible cultivar MQ 76/53, grey bars = resistant cultivar R 365), between 72 and 240 hours post-infestation. Mean were highly significantly different between both cultivars ($P < 0.0001$) at each date.

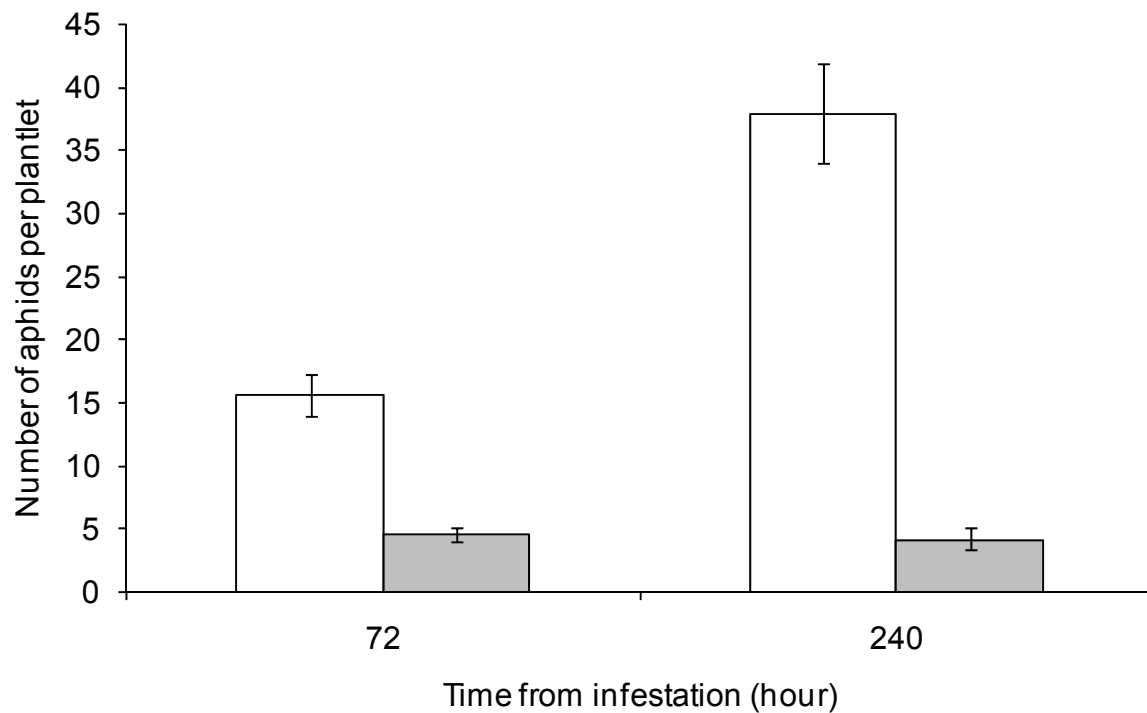


Figure 3: Evolution of the number (mean \pm SEM) of aphids per plant in no-choice settling behaviour experiments on R 365 (square) and MQ 76/53 (circle) three week-old sugarcane plantlets infested with 10 L2-L3 *M. sacchari* larvae. Mean were significantly different ($P < 0.001$) between both cultivars from 8 hours after infestation.

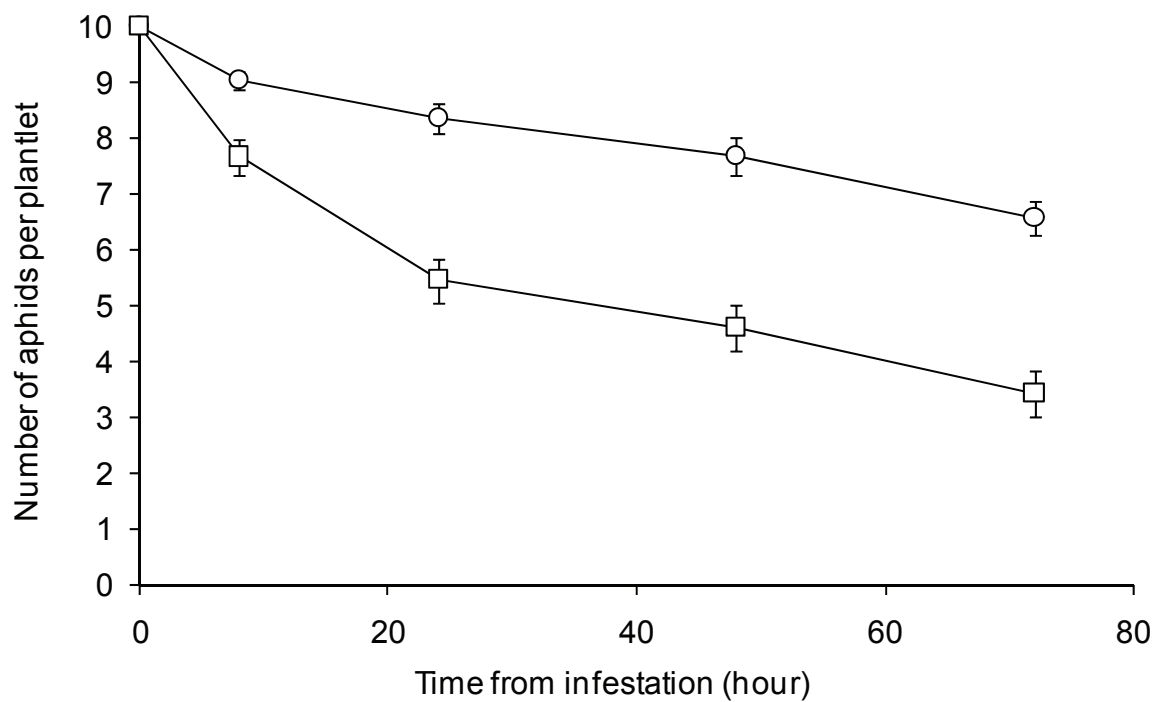
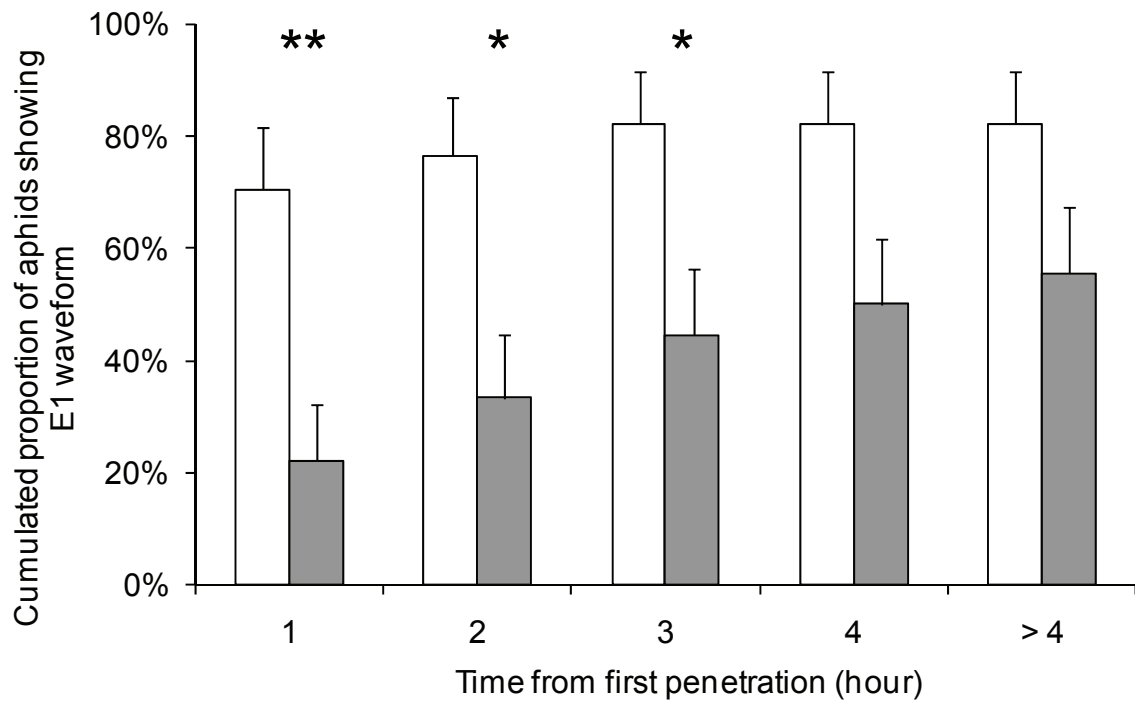


Figure 4: Evolution of the cumulated proportion (\pm SD) of *M. sacchari* showing at least one E1 waveform from 1 to more than 4 hours after first penetration (white bars: MQ 76/53; grey bars: R 365). * and ** : proportions significantly different, respectively at $P < 0.05$ and $P < 0.01$.



CHAPITRE III : Taxonomie, diversité et structuration des populations de Melanaphis sacchari

TOUTES les Observations précédentes ont eu pour principal objet de prouver qu'il n'y a réellement aucun accouplement parmi les Pucerons, qu'ils sont des espèces d'Hermaphrodites du genre le plus singulier ; des Hermaphrodites qui se suffisent à eux-mêmes : & c'est, je crois, ce qui paroîtra démontré à ceux qui liront ces Observations.

Charles Bonnet (1745)

« *Traité d'insectologie ou Observations sur les pucerons* »

Chapitre 3 : Taxonomie, diversité et structuration des populations de *Melanaphis sacchari*

Au cours de cette étude, nous avons étudié la taxonomie et la diversité à l'échelle mondiale de pucerons de la canne à sucre, groupés dans un complexe taxonomique autour de l'espèce-type *Melanaphis sacchari*. Cette espèce est d'importance économique croissante, puisqu'elle est le vecteur le plus efficace du SCYLV, un virus responsable de la maladie de la feuille jaune, récemment décrite et affectant la canne à sucre sur l'ensemble de son aire de répartition. Cette étude a été conduite avec deux objectifs principaux.

Le premier objectif était de tenter d'apporter un éclaircissement à la situation taxonomique des espèces présentes sur canne à sucre, et notamment la distinction entre *Melanaphis sacchari* et *Melanaphis sorghi*. Pour cela, nous avons choisi de confronter des critères morphologiques décrits avec des données moléculaires basées sur la variabilité d'un fragment de 658pb de la séquence barcoding (Cytochrome Oxydase I).

Le second objectif était d'étudier l'effet de la plante hôte et de la localisation géographique sur la structuration des populations de pucerons, à l'aide d'outils de génétique des populations. Cette seconde partie de l'étude a été conduite en trois étapes : (i) nous avons développé une banque de microsatellites spécifiques de *Melanaphis sacchari*, (ii) nous avons étudié la diversité à l'échelle mondiale, sur une collection de 1288 individus, couvrant 42 localités dans 14 pays, et enfin (iii) nous avons étudié la structuration des populations à l'échelle de la Réunion.

Les données morphologiques ont confirmé l'existence d'une discontinuité morphologique entre les individus du groupe *sacchari*, à la distribution mondiale à l'exception de l'Afrique de l'Ouest, et ceux du groupe *sorghi*, restreints à l'Afrique. Un troisième sous-ensemble, composé des individus de Hawaï et Louisiane, a été détecté et pourrait constituer un autre groupe taxonomiquement distinct. L'analyse de la séquence COI a montré une très faible variabilité au sein de la population mondiale : seuls trois haplotypes ont été détectés au sein de nos populations, pour une divergence maximale de 0.46% entre séquences. Les résultats de cette analyse moléculaire sont globalement convergents avec l'analyse morphologique, à l'exception de certains individus appartenant au groupe morphologique *sacchari* et présentant une séquence COI identique à celle des individus *sorghi*.

La création d'une banque microsatellite spécifique de *Melanaphis sacchari* a permis de générer 14 marqueurs polymorphes, dont 10 ont été retenus pour l'étude de diversité. L'analyse de la diversité mondiale a révélé une faible diversité génétique : seuls 18 génotypes multilocus (MLGs) ont été trouvés, dont seulement cinq représentent 87% de l'effectif mondial échantillonné. Aucun effet de la plante hôte n'a été observé sur la structure des populations : seule la localisation géographique conditionne la répartition des MLGs. De même, aucune trace de reproduction sexuée n'a été détectée dans les populations, ce qui suggère un fort cloisonnement des populations, et une diversification génétique locale faible par mutation. Quatre groupes de MLGs ont ainsi pu être distingués sur la base d'un arbre Neighbour-Joining calculé à partir d'une distance D_{AS} :

- un groupe africain composé des individus *sorgho* ;
- un groupe australien composé d'individus '*sacchari*' par leur morphologie, mais présentant une homologie de séquence avec les individus africains de type '*sorgho*' pour le fragment de COI.
- un groupe comprenant les individus de Hawaï et Louisiane, dont la similarité suggère que les individus récoltés en Louisiane, où la description de *M. sacchari* est récente, ont été introduits depuis Hawaï au cours des dernières décennies.
- et enfin un groupe 'mondial' composé des populations du pourtour de l'Océan Indien, des Antilles et d'Amérique du Sud. Ce dernier groupe d'individus est majoritairement composé d'un génotype unique, observé dans l'ensemble des 8 régions du groupe, et représentant à lui seul un quart de l'échantillon mondial. Ce génotype pourrait constituer une lignée de type superclone invasif : on le trouve partout en Amérique du Sud, où *M. sacchari* n'est décrit que depuis une cinquantaine d'années ; ainsi qu'au Kenya dans la seule population comprenant des individus *sacchari* et *sorgho* en mélange

Ce travail constitue la première étude de diversité de *Melanaphis sacchari* à l'échelle mondiale, et souligne son potentiel invasif. Les travaux de taxonomie n'ont pas permis de lever l'ambiguïté sur les relations taxonomiques entre les différents groupes de puceron. Nous suggérons de les considérer comme entités distinctes, sans toutefois s'y référer en tant qu'espèces de façon certaine : en effet, il est possible qu'elles constituent les ramifications modernes d'une dispersion ancestrale à partir d'une population source.

A l'échelle de la Réunion, où un échantillonnage plus fin a été réalisé, la situation semble différente des autres régions échantillonnées : la diversité génotypique y est la plus forte, avec

13 MLGs, dont 12 uniquement trouvés à la Réunion, et les populations sont structurées par la plante hôte, certains clones étant trouvés préférentiellement sur canne à sucre ou sorgho sauvage (*Sorghum verticilliflorum*).

Publications associées au chapitre :

Characterization and isolation of polymorphic microsatellite loci from the Sugarcane Aphid *Melanaphis sacchari* (Zehntner) :

Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, M. Andris, G. I. Aradottir, G. Arnau, A. Audzijonyte, E. C. Bess, F. Bonadonna, G. Bourdel, J. Bried, G. J. Bugbee, P. A. Burger, H. Chair, P. C. Charruau, A. Y. Ciampi, L. Costet, P. J. DeBarro, H. Delatte, M. P. Dubois, M. D. B. Eldridge, P. R. England, D. Enkhbileg, B. Fartek, M. G. Gardner, K. A. Gray, R. M. Gunasekera, S. J. Hanley, N. Haval, J. P. Hereward, S. Hirase, Y. Hong, P. Jarne, Q. Jianfei, R. N. Johnson, M. Kanno, A. Kijima, H. C. Kim, K. S. Kim, W. J. Kim, E. LaRue, J. W. Lee, J. H. Lee, C. Li, M. Liao, N. Lo, A. J. Lowe, T. Malausa, P. J. G. Malé, M. D. Marko, J. F. Martin, R. Messing, K. J. Miller, B. W. Min, J. I. Myeong, S. Nibouche, A. E. Noack, J. K. Noh, J. Orivel, C. J. Park, D. Petro, K. Prapayotin-Riveros, A. Quilichini, B. Reynaud, C. Riginos, A. M. Risterucci, H. A. Rose, I. Sampaio, K. Silbermayr, M. B. Silva, N. Tero, R. A. Thum, C. C. Vinson, A. Vorsino, C. R. Vossbrinck, C. Walzer, J. C. White, A. Wiczorek and M. Wright (2010). "Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 June 2010 – 31 July 2010." Molecular Ecology Resources **10**(6): 1106-1108.

B. Fartek ^{1,2}, S. Mississippi ¹, S. Nibouche ^{1*}, L. Costet ¹, H. Delatte ¹ & B. Reynaud ¹

Molecular diversity of the sorghum and sugarcane aphids from the *Melanaphis sacchari* group.

Soumission envisagée dans la revue Molecular Ecology pour Juin 2011.

B. Fartek ^{1,2*}, S. Mississippi ¹, S. Nibouche ¹, L. Costet ¹, H. Delatte ¹ & B. Reynaud ¹

Molecular diversity and host plant association of the aphid *Melanaphis sacchari* in Reunion.

En préparation.

I Développement d'une banque de loci microsatellite spécifique à *Melanaphis sacchari*

1 Characterization and isolation of polymorphic microsatellite loci from the Sugarcane

2 Aphid *Melanaphis sacchari* (Zehntner)

4 Authors

5 B.Fartek^{1,2}, S. Nibouche¹, A.M. Risterucci³, H. Delatte¹, B. Reynaud¹ and L. Costet¹

7 Addresses

8 ¹Cirad, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, la Réunion, France

9 ²Université de la Réunion, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, la Réunion, France

10 ³Cirad, UMR DAP, F-34398 Montpellier, France

12 Corresponding author

13 Benjamin Fartek, Cirad, Pôle de Protection des Plantes, 7 chemin de l'IRAT, F-97410 Saint-
14 Pierre, France. Email: benjamin.fartek@cirad.fr

16 Keywords

17 *Melanaphis sacchari*, microsatellites, genetic diversity, sugarcane, aphid.

21 **Abstract**

22 Fourteen polymorphic microsatellite markers were developed to study the clonal diversity of
23 the sugarcane aphid *Melanaphis sacchari* from a repeat-enriched genomic library. Allelic
24 diversity was estimated on aphids collected on sugarcane originating from nine locations. The
25 number of alleles per locus ranged from two to five. Six multilocus genotypes were identified.
26 Population genetic parameters were computed from a population from Reunion and revealed
27 features that are common for parthenogenetic aphid species: (i) observed heterozygosity
28 ranged from 0.94 to 1 and exceeded significantly expectations for all loci and (ii) significant
29 linkage disequilibrium was found for all pairwised loci comparisons.

30

The sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari* (Zehntner, 1897), is a common pest on sugarcane and sorghum. Its geographical distribution is worldwide, including most of the cultivating areas of its host plants. Sexual morphs of *M. sacchari* have been described in Southern Asia, but its breeding system is assumed to be mainly anholocyclic worldwide, reproducing by apomictic parthenogenesis (Blackman *et al.* 1990). Populations of this aphid species are therefore assumed to be constituted of a mix of clonal lineages. A better understanding of the role of geographic distribution and host plant on the genetic diversity could help to improve management of this pest. Microsatellites is the tool of choice when it comes to unveiling the clonal diversity of populations, especially when this diversity is assumed to be low (Sunnucks *et al.* 1997).

In this note, we report the isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite loci specific to *M. sacchari*.

Whole genomic DNA for library construction was extracted following a protocol modified from Baruffi *et al.* (1995) using aphids sampled from 12 locations worldwide. Insects were kept in 70 % ethanol, and we identified each sample as *Melanaphis sacchari* according to Blackmann and Eastop (2000). Aphids were placed in 2 ml Eppendorf tubes with a glass bead containing 200 µl of buffer 1 (100 mM NaCl, 200 mM sucrose, 100 mM Tris-HCl pH 9.1, 50 mM EDTA, and proteinase K to a final concentration of 100 µg/mL). Then the tubes were placed into a Tissue Lyser (Qiagen) at 30 Hz for 2 min. After a brief centrifugation, 200 µL of buffer 2 (buffer 1 with 0.5 per cent SDS) was added per tube. The homogenate was incubated at 65°C for 15 min. Then buffer 3 (8 M potassium acetate) was added to a final concentration of 1 M, the mixture was then centrifuged 15 min at 15,000 g. The supernatant was collected and mixed with 2.5 volumes of absolute ethanol, left at room temperature for 5 min and centrifuged again for 15 min at 15,000 g. The resulting precipitate was washed with 200 µL of

55 70 % ethanol, then dried and resuspended in 100 μ L of TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM
56 EDTA).

57 Microsatellite-enriched libraries (GA)_n and (GT)_n were constructed according to Billotte *et al.*
58 (1999) with slight modification as follows. DNA was restricted by *Hae*III (Biolabs) and
59 submitted to a hybridization-based capture with biotin-labelled microsatellite oligoprobes
60 I5(CT)₈ and I5(CA)₈ and streptavidin-coated magnetic beads (Promega). It was then cloned in
61 the pGEM-T vector (Promega) and transformed by electroporation into competent DH10B
62 cells (Invitrogen). Among white colonies, 192 were screened by PCR (Polymerase Chain
63 Reaction) amplification directly from bacterial colonies using RSA21 primer. We transferred
64 PCR products on Hybond-N + nylon membranes (Amersham), which were hybridized at 56
65 °C with [γ 32P] dATP 5'-end labelled (GT)₁₅. One hundred fourteen positive clones were
66 sequenced (Cogenics). Among those clones, 91 sequences bearing microsatellite motives
67 were found. Sequences were checked and aligned, and SSR motives detected with SAT
68 software (Dereeper *et al.* 2007). This software was used to design primers on the targeted
69 sequences and flanking regions of microsatellite motives that we double-checked manually.

70 Fifty-four sequences having adequate flanking regions and repeat motif were selected for a
71 first primer design. We evaluated the variability of these loci in two steps: we first checked
72 for polymorphism in each locus for eight aphids covering the worldwide diversity and nine
73 aphids from three localities in Reunion. DNA extraction and PCR amplification for this step
74 were performed according to Carletto *et al.* (2009), and products checked using
75 electrophoresis on MetaPhor (TEBU) agarose 4% gels. Eighteen loci showing good-quality
76 PCR products were selected from this step. Secondly, we genotyped 217 individuals from
77 nine populations sampled in nine sugarcane fields from distant locations: Reunion (three
78 locations), Guadeloupe (French West Indies), Louisiana (USA), Hawaii (USA), Benin,
79 Mauritius and Australia. Four out of these nine locations were common with locations used

Table 1. Characterization of polymorphic loci isolated in *Melanaphis sacchari*. Primer mix: loci with the same letter were associated in the same primer mix, Tm: locus-specific annealing temperature, A: number of alleles, Ho: observed heterozygosity, He: expected heterozygosity, Fis: fixation index, nc: not computed.

locus - Genebank accession n°	repeat motif	Primer sequences	primer mix	Tm	worldwide population		single population (Reunion)				
					allele range size (pb)	A	A	He	Ho	Fis	sampled / genotyped
CIR-Ms-B09 - GU145081	(tg)8	F : AACGCTTATTGACGAACG R : GGTAACGGATTTCGATGT	A	55°C	238-240	2	2	0.51	1	-1	32 / 32
CIR-Ms-B12 - GU145082	(tg)13	F : TTTTGACGAAGAGAACTCG R : CCCCAAACGGACTGTAAT	B	55°C	140-153	4	2	0.51	1	-1	31 / 32
CIRAD4-E03 - HM104439	(ca)20	F : GTGCAGTCCACCGTAAAA R : AGAACCGACCATTTGTTGT	A	54°C	176-193	4	2	0.51	1	-1	32 / 32
CIR-Ms-D02 - HM104440	(tc)18	F : GGTGAACGCATCTAACG R : TATGCAGACGGACAGGTT	B	55°C	220-234	5	2	0.51	1	-1	30 / 32
CIR-Ms-C08 - GU145084	(ca)15	F : ACGTTACACTCGGCAAGA R : CCATAAAACGTCAGGTCAA	A	55°C	189-203	5	3	0.54	1	-0.886	32 / 32
CIR-Ms-G01 - GU145086	(gt)18	F : AATCGGGATCAGAATGT R : TCGGCGTACAGATCAAAC	B	55°C	185-210	3	2	0.51	1	-1	31 / 32
CIR-Ms-G02 - GU145087	(tg)15	F : CCAGGGAACATTATTGAAA R : GGTCATTTGATGGTTTCTT	A	52°C	199-205	4	3	0.55	0.94	-0.737	32 / 32
CIR-Ms-G12 - GU145089	(ca)12	F : ACTGCCGTTTAAAGTGAGGT R : GCACACGTCGAGATCAAT	B	55°C	212-216	3	2	0.51	1	-1	31 / 32
CIR-Ms-G403 - GU145090	(tc)11	F : ACAGAAATGCGATTGGAAA R : CCACTGCGATGTAGGTGT	A	55°C	251-259	3	2	0.51	1	-1	32 / 32
CIR-Ms-B03 - GU145080	(ac)6	F : TTCATTTTCGTGGAAGAGG R : TTGCGATTTCGTATGGATT	B	55°C	213-215	2	1	nc	nc	nc	21 / 32
CIR-Ms-C03 - GU145083	(tg)7	F : CCCTCCTCGACACAACATA R : CCCATGAGTAGACACAAAGAC	B	55°C	145-155	2	1	nc	nc	nc	31 / 32
CIR-Ms-E01 - GU145085	(ac)8	F : CAGCTCTGTTCACGTCT R : TGACAACCCCGCTAAATA	A	55°C	245-247	2	1	nc	nc	nc	32 / 32
CIR-Ms-G08 - GU145088	(tg)7	F : CTACTGCGTGCATCCT R : GTGCGATAGTCCACGATT	A	55°C	229-233	2	1	nc	nc	nc	32 / 32
CIR-Ms-H02 - GU145091	(ac)10	F : TACGCGACAATCATACGC R : CGTATTACAAATGCGATTCA	A	56°C	194-198	2	1	nc	nc	nc	32 / 32

for the construction of the microsatellite library. A multiplexed PCR (see table 1 for detail of primer mixes) was performed in a final volume of 15 μ L including 1 μ L of DNA extract, 0.3 μ M of each primer and 2X master mix of Qiagen multiplex PCR kit. Primer pairs were arranged in two mixes (see final distribution of mixes in table 1) and fluorescently labelled according to their relative size range. We used the following procedure for amplification: denaturation at 95°C for 15 min, 25 cycles consisting of 30 s of denaturation at 94°C, 1 min 30 s of annealing at 54°C, and 30 s of elongation at 72°C. We used an ABI prism 3110 for genotyping after addition of an internal size standard for each sample (GeneScan LIZ 500, Applied Biosystems). Allele identification at each locus was performed by comparison with the size standard using the Genemapper version 2.5 software (Applied Biosystems).

Among the 18 loci, four were monomorphic and removed from the study. The fourteen remaining exhibited between two to five alleles among the nine distant populations.

Characterisation of the loci was carried out on a single sample of 32 individuals from Reunion, collected in the same sugarcane field. Five loci (Ms_E01, Ms_G08, Ms_H02, Ms_B03, Ms_C03) displayed only one allele in this sample, and two alleles at the worldwide scale. These loci were included in table 1 but not used for further analyses. For the nine other loci, population genetic parameters were computed with Genepop version 4.0.10 (Raymond et Rousset 1995) on the 32 individuals from the single sample. All of the loci showed deviations from Hardy-Weinberg equilibrium, with a significant heterozygote excess. Pairwised tests were performed and indicated linkage disequilibrium among all pairs of loci. Analysis of data using Micro-Checker 2.2.3 software (Van Oosterhout *et al.* 2004) did not reveal any evidence for null allele within the tested sample set. Along with the important heterozygote excess, F_{is} values close or equal to -1 and the presence of LD between loci are typical features of an

aphid population strictly reproducing by apomictic parthenogenesis, resulting in low clonal diversity (Halkett *et al.* 2005).

Over the nine worldwide populations, six MLGs were detected. Four of them represented between 20 and 32 % of the 217 sampled individuals, and the two others 1 and 3%. In the single population from Reunion, three MLGs, separated at two loci, were detected. One major MLG represented 89% of individuals, the two other being minor MLGs (9 and 1%). These first results could suggest that the markers do not detect enough variability for population level analyses. Nevertheless, similar studies carried out on *Sitobion avenae* (Figueroa *et al.* 2005) or on *Aphis gossypii* (Carletto *et al.* 2009) feature low intra-sample clonal diversity, where most samples encompass a few predominant MLGs. In such situations, the sampling of a low number of populations would lead to the identification of few MLGs. Genotyping of a large number of populations of *M. sacchari* at a worldwide scale, collected on *Sorghum* sp., *Saccharum* sp., and *Pennisetum* sp., is under progress and could reveal a higher level of diversity and will indicate which markers among the 14 are actually useful for distinguishing host specificity or geographic distribution.

Acknowledgements: This work was funded by the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), by the Conseil Régional de la Réunion and by the European Regional Development Fund (ERDF).

We would like to thank the people who were involved in the gathering of our worldwide aphid sample collection: P. Rott and J.C. Girard for all the contacts and queries, T. Martin (Benin), W. S. White (Louisiana), S. Schenck (Hawaii), A. Ratnadass (Niger), T. Brévault (Cameroon), R. Goebel and N. Sallam (Australia), S. Ganeshan (Mauritius), J. H. Daugrois (French West Indies), G. Victoria (Columbia) and R. Tibère (Reunion).

References:

- Baruffi L, Damiani G, Guglielmino C, *et al.* (1995) Polymorphism within and between populations of *Ceratitis capitata*: comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. *Heredity* **74**, 425-437.
- Billotte N, Lagoda P, Risterucci A, *et al.* (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* **54**, 277-288.
- Blackman RL, Eastop VF (2000) *Aphids of the world crops: an identification and information guide, 2nd edition* John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.
- Blackman RL, Eastop VF, Brown PA (1990) The biology and taxonomy of the aphids transmitting barley yellow dwarf virus. In: *World Perspectives on Barley Yellow Dwarf International Workshop* (ed. Burnett PA), pp. 197-214. CIMMYT, Udine (Italy).
- Carletto J, Lombaert E, Chavigny P, *et al.* (2009) Ecological specialization of the aphid *Aphis gossypii* Glover on cultivated host plants. *Molecular Ecology* **18**, 2198-2212.
- Dereeper A, Argout X, Billot C, *et al.* (2007) SAT, a flexible and optimized Web application for SSR marker development. *BMC bioinformatics* **8**, 465.
- Figueroa CC, Simon JC, Le Gallic JF, *et al.* (2005) Genetic structure and clonal diversity of an introduced pest in Chile, the cereal aphid *Sitobion avenae*. *Heredity* **95**, 24-33.
- Halkett F, Simon J-C, Balloux F (2005) Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 194-201.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of heredity* **86**, 248.

154 Sunnucks P, Barro PJD, Lushai G, *et al.* (1997) Genetic structure of an aphid studied using
155 microsatellites: cyclic parthenogenesis, differentiated lineages and host specialization.
156 *Molecular Ecology* **6**, 1059-1073.

157 Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, *et al.* (2004) micro-checker: software for
158 identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*
159 **4**, 535-538.

II Taxonomie et diversité mondiale du complexe d'espèces *Melanaphis* spp de la canne à sucre et espèces apparentées.

**Molecular diversity of the sorghum and sugarcane aphids from the *Melanaphis sacchari*
group.**

B. Fartek ^{1,2}, S. Mississippi ¹, S. Nibouche ^{1*}, L. Costet ¹, H. Delatte ¹ & B. Reynaud ¹

¹ Cirad, UMR PVBMT, F-97410 Saint Pierre, La Réunion, France

² Université de la Réunion, UMR PVBMT, F-97410 Saint Pierre, La Réunion, France

*** Correspondence:** samuel.nibouche@cirad.fr

Short title: population structure of *Melanaphis sacchari*

Abstract

Invasive species constitute a real challenge in modern agriculture, either for the direct damage that may be caused by the unprecedented introduction of a new pest species or lineage, or from an epidemiological point of view in the case of the transmission of vector-borne diseases. Taxonomy and worldwide clonal diversity were investigated in the sugarcane aphid species complex from the *Melanaphis sacchari* group which are pest of growing concern in sugarcane culture, responsible for the transmission of the *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV). The purposes of the study were (i) to clarify the taxonomic position between the two forms *Melanaphis sacchari* and *M. sorghi* and (ii) to investigate the effect of geography and host plant (mainly sorghum and sugarcane) on genotypic structuration of populations in a worldwide sample of 1288 individuals (52 samples, 42 localities, 14 geographical regions). Taxonomy studies based on morphometric criteria confirmed the existence of two distinct populations matching the *sacchari* / *sorghi* separation described in literature, the first one being spread worldwide, and the second restricted to Africa. Sequencing of barcoding loci revealed four haplotypes, one of which entirely made up of *sorghi* individuals, thus roughly supporting the morphometric separation. Population genetic studies showed that populations are highly structured by geography at the worldwide scale, with no effect of host plant detected. Low clonal diversity at the local scale, and high LD between pairs of loci was observed, indicating the absence of sexual admixture in our samples. Four MLG groups were detected : (i) African individuals from the *sorghi* form, (ii) Australia, (iii) USA, and (iv) individuals from the rest of the world, including Eastern Africa. One MLG was observed in 8 out of 14 geographical regions, accounting for 26 % of the worldwide sample, and suits the pattern of an invasive genotype that would have spread around the world. This work is the first insight on the population genetics of this species, and highlights its high invasive

43 potential, which can be a future concern in the epidemiology of several sugarcane diseases of
44 economic importance.

45

46 **Keywords:** invasive clonal species, population genetics, asexual lineages, emerging pest.

47

Introduction

The yellow leaf disease is a recently characterized disease of sugarcane, caused by a *Polerovirus* of the *Luteoviridae* family, the *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV). This disease, transmitted by at least four aphid species (Rott *et al.*, 2008), has a worldwide economical importance and may cause severe yield losses in some cultivars (Lehrer *et al.*, 2009; Rassaby *et al.*, 2003). Varietal resistance appears as the most promising method to control the disease (Rott *et al.*, 2008). For vector borne viral diseases, especially caused by circulatorily transmitted virus species, resistance to the vector could be a way to improve the resistance to the disease by reducing virus incidence (Katis *et al.*, 2007; van Emden, 2007; Westwood, Stevens, 2010). Study of varietal resistance of sugarcane to aphids is at its beginning (Akbar *et al.*, 2010). Most of aphid resistance are specific to a single aphid species or few biotypes within a species (Dogimont *et al.*, 2010) and it has been demonstrated that variability exists among clonal lineage of aphids in their response to resistant cultivars (Caillaud *et al.*, 1995; Lombaert *et al.*, 2009). Therefore, characterization of the genetic diversity of the vector is critical in crop breeding for durable and efficient resistance, which has to take into account the worldwide diversity of these pests and the potential emergence of new invasive biotypes or species.

Schenk and Lehrer (2000) demonstrated that the aphid *Melanaphis sacchari* (Zehntner, 1897) (Homoptera, Aphididae) was one of the vectors of SCYLV. This species is considered as the most common and most efficient vector of the disease (Rott *et al.*, 2008). *M. sacchari* is also considered as a major pest of sorghum (Singh *et al.*, 2004). This species, considered as mainly anholocyclic, is present in America, Australia, Asia and Africa (Blackman, Eastop, 2000). The old world genus *Melanaphis* van der Groot 1917 comprises around 20 species associated with Poaceae (Blackman, Eastop, 2000), most of these originating from Eastern Asia. On

Supplementary Table 1. Characteristics of aphid samples.

Sample	Region	Location	Date of sampling	Host plant (com.)	Host plant (sci.)	sample size
Aus1	Australia	Meringa, Gordonvale	February-09	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	32
Aus2	Australia	Meringa, Gordonvale	February-09	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	37
Aus3	Australia	Mackay	February-09	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	18
Ben1	Benin	Pahou	September-07	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	31
Ben2	Benin	Malanville	September-07	pearl millet	<i>Pennisetum typhoides</i> (Burm.) Stapf. & Hubb.	32
Ben3	Benin	Kandi	September-07	sorghum	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	32
Ben4	Benin	Pade	September-07	sorghum	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	24
Bra1	Brazil	Uberlandia	April-09	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	32
Cam1	Cameroon	Garoua	November-07	sorghum	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	32
Cam2	Cameroon	Garoua	January-08	sorghum	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	24
Cam3	Cameroon	Moulvoudaye	October-07	sorghum	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	38
Cam4	Cameroon	Mokong	October-07	sorghum	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	31
Cam5	Cameroon	Tcholliré	November-07	sorghum	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	31
Col1	Columbia	Jamun di valle	June-08	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	23
Col2	Columbia	Tulua valle	June-08	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	31
Col3	Columbia	Tulua valle	June-08	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	21
Ecu1	Ecuador	M. Maridueñas, Guaya	March-09	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	18
Gua1	Guadeloupe	Marie Galante	June-09	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	13
Gua2	Guadeloupe	St Jean, Petit Bourg	June-09	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	10
Gua3	Guadeloupe	St Jean, Petit Bourg	June-09	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	11
Gua4	Guadeloupe	Le moule, Gardel	June-09	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	15
Gua5	Guadeloupe	Lamentin, Grosse Montagne	June-09	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	32
Haw1	Hawaii	Maunawille	August-07	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	12
Haw2	Hawaii	Mauni	August-07	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	20
Haw3	Hawaii	Maunawille	September-07	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	32
Ken1	Kenya	Mtwapa 100	October-08	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	26
Ken2	Kenya	Mtwapa 100	October-08	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	19
Ken3	Kenya	Mtwapa 100	October-08	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	30
Ken4	Kenya	Mtwapa 90	October-08	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	29
Ken5	Kenya	Kesref - Cymmit	September-08	sorghum	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	8
Lou1	Louisiana	Terrebonne	August-07	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	25
Lou2	Louisiana	Assumption	August-07	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	30
Lou3	Louisiana	Lafourche	August-07	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	29
Lou4	Louisiana	Lafourche	August-07	johnsongrass	<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.	30
Lou5	Louisiana	St. Mary	September-07	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	32
Lou6	Louisiana	Rapides	September-07	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	30

sugarcane, three *Melanaphis* species were listed by Blackman and Eastop (2006): *M. sacchari*, *M. sorghi* (Theobald, 1904) and *M. indosacchari* (David, 1956). *M. indosacchari* is known only from India and Philippines (Blackman, Eastop, 2006), while *M. sorghi* is present in Africa and in Asia. In their catalog, Remaudière and Remaudière (1997) placed *M. sorghi* in synonymy of *M. sacchari*. Blackman et al. (1990) reported that individuals originating from sorghum had a shorter antennal terminal process relative to length of the hind tibia than individuals from sugarcane. They hypothesized that the two groups were more likely distinct taxa, although the separation needed to be confirmed by experimental studies. Host plant preference is not absolute and both forms are capable of infesting sugarcane as well as sorghum, and various tropical grasses. Analysis of this taxonomic distinction with molecular tools, as well as evaluating host preference of the aphids, is an important issue for characterization of the epidemiological factors affecting the spreading of the yellow leaf disease.

The purpose of this study, based on a vast worldwide sampling of aphids covering its area of distribution, was twofold. The first goal was to clarify the taxonomic status of the two forms *M. sacchari* and *M. sorghi*, by comparing morphometric data with molecular data. The second part deals with evaluating the worldwide diversity and structuring of aphid populations, using microsatellite markers.

Materials and Methods :

Insect samples

The whole set of individuals (**Supp. Tab. 1**) consisted in 52 samples from 42 localities in a total of 13 regions (countries or states), and from five host plants: sugarcane, pearl millet, and

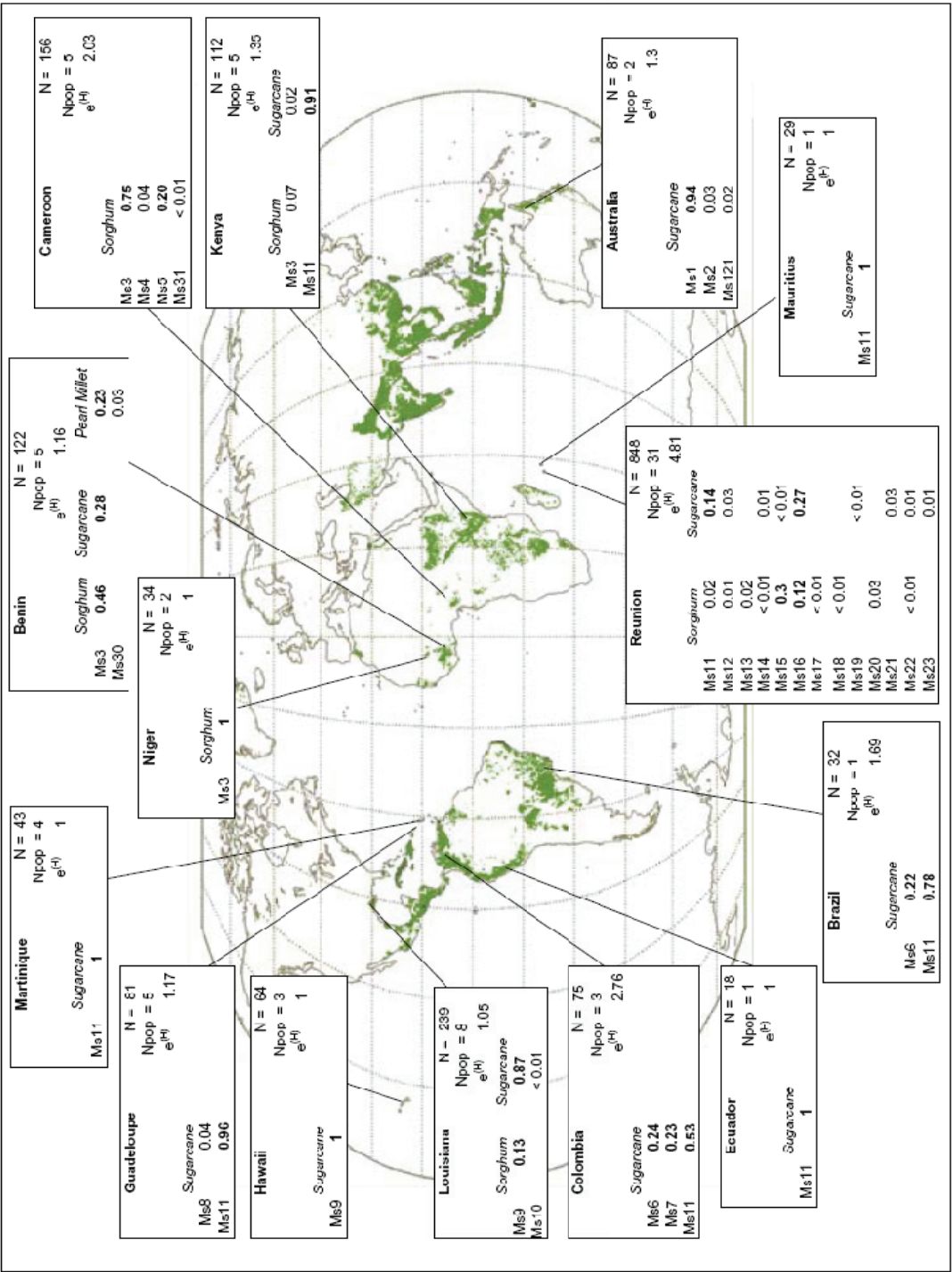


Figure 2. Sampling map of *M.sacchari* and MLG frequencies for each region. Green patterns indicate the growing area of sugarcane. Each box contains the total number of individuals sampled from the same region. (N), the number of sub-populations sampled (Npop), the global diversity index for the concerned region ($e^{(H)}$), the host plants used for collection, and frequency for each MLG (bold characters for frequencies above 0.1).

three wild or cultivated sorghum species (*Sorghum bicolor*, *S. halepense*, *S. verticilliflorum*). The latter were considered as a single host plant, hereafter named “sorghum”. Aphids were collected from field and placed in 70% ethanol in eppendorf tubes, kept frozen at -80°C until they were processed. Only few aphids were collected on each sampled plant to avoid collecting several individuals from the same isofemale colony. Sampling effort was carried out from 2002 to 2009, was realised by our team in Reunion and by colleagues for the other parts of the world (see in acknowledgements). Extractions were done according to the “salting-out” protocol from Sunnucks and Hales (1996). Briefly, it consists in extracting DNA from whole aphids by crushing them in a TNES/Proteinase K buffer and precipitating DNA in ethanol. This method is fast and simple, and provided sufficient DNA amount for phylogeny and microsatellite PCR analyses.

Barcoding with Cytochrome Oxydase gene I (COI)

The phylogenetic relationship between individuals was studied by sequencing the Cytochrome Oxydase I (COI) barcoding region. Thirty three aphids were chosen among the worldwide sample, to ensure that the most frequent microsatellite genotypes described were represented in different regions and host plant combination. COI fragments were amplified using the LCO1490 and HCO2198 primers, designed by Folmer et al. (1994). PCR was carried out using the protocol from Kim and Lee (2008). PCR products were purified and sequenced by a subcontractor (Cogenics), and a consensus sequence of 658pb was chosen for later analyses. Sequence alignments were realised using Mega4 (Tamura *et al.*, 2007) software, and Mr Bayes (Huelsenbeck, Ronquist, 2001) was used to reconstruct the subsequent phylogenetic tree, using the AIC likelihood calculated with jModeltest (Posada, Buckley, 2004) to choose the most reliable evolutionary model. The tree was rooted with sequences from *Melanaphis bambusae* retrieved from Genbank (referenced

Table 2. Observed microsatellite Multi Locus Genotypes (MLG): allele size (bp) at each locus, distribution by host plant and in each of the four NJ tree group defined in Fig. 4. Large boxes indicate loci that are polymorphic within a NJ tree group. Underlining indicates the most frequent MLG in the group. Small boxes indicate within group allelic variations between the less frequent MLGs and the most frequent MLG. na = null allele. Frequency = frequency of the MLG in the whole 1288 individual sample.

NJ tree group	MLG	CIR- Ms- G08	CIR- Ms- G403	CIR- Ms- B03	CIR- Ms- C08	CIR- Ms- G01	CIR- Ms- E01	CIR- Ms- G12	CIR- Ms- G02	CIR- Ms- E03	CIR- Ms- D02	Number of individuals		Frequency (%)
												sugarcane	sorghum & millet	
Africa	Ms3	229 / 229	253 / 253	215 / 215	189 / 203	206 / 206	245 / 247	214 / 216	na / na	176 / 176	220 / 228	215	61	21.4
	Ms4	229 / 229	253 / 253	215 / 215	189 / 203	206 / 206	245 / 247	214 / 216	na / na	176 / 176	220 / 226	7	7	0.5
	Ms5	229 / 229	253 / 253	215 / 215	189 / 203	206 / 210	245 / 247	214 / 216	na / na	176 / 176	220 / 228	31	31	2.4
	Ms30	229 / 229	253 / 253	215 / 215	189 / 203	204 / 206	245 / 247	214 / 216	na / na	176 / 176	220 / 228	4	4	0.3
	Ms31	229 / 229	253 / 253	215 / 215	189 / 203	206 / 206	245 / 247	214 / 216	na / na	176 / 176	228 / 230	1	1	0.1
South America – Caribbean – Indian Ocean	Ms6	233 / 233	251 / 259	213 / 213	197 / 199	186 / 210	247 / 247	212 / 216	199 / 199	186 / 192	228 / 234	25	25	1.9
	Ms7	233 / 233	251 / 259	213 / 213	197 / 199	186 / 210	247 / 247	204 / 212	199 / 199	186 / 192	228 / 232	17	17	1.3
	Ms8	233 / 233	251 / 259	213 / 213	197 / 199	186 / 212	247 / 247	212 / 216	199 / 199	186 / 192	228 / 232	3	3	0.2
	Ms11	233 / 233	251 / 259	213 / 213	197 / 199	186 / 210	247 / 247	212 / 216	199 / 199	186 / 192	228 / 232	334	334	25.6
	Ms12	233 / 233	251 / 259	213 / 213	195 / 197	186 / 210	247 / 247	212 / 216	199 / 205	186 / 192	228 / 232	5	5	0.4
	Ms15	233 / 233	251 / 259	213 / 213	197 / 199	186 / 210	247 / 247	212 / 216	199 / 201	186 / 192	228 / 232	42	42	3.3
	Ms16	233 / 233	251 / 259	213 / 213	195 / 197	186 / 210	247 / 247	212 / 216	199 / 203	186 / 192	228 / 232	95	31	9.8
	Ms21	233 / 233	251 / 259	213 / 213	195 / 197	186 / 210	247 / 247	212 / 216	199 / 203	186 / 192	228 / 232	27	27	2.1
	Ms9	233 / 233	251 / 259	213 / 213	197 / 199	186 / 206	247 / 247	212 / 216	201 / 201	186 / 188	226 / 234	271	30	23.4
	Ms10	233 / 233	251 / 259	213 / 213	197 / 199	186 / 206	247 / 247	212 / 218	201 / 201	186 / 188	226 / 234	2	2	0.2
USA	Ms9	233 / 233	251 / 259	213 / 213	197 / 199	186 / 206	247 / 247	212 / 216	201 / 201	186 / 188	226 / 234	271	30	23.4
	Ms10	233 / 233	251 / 259	213 / 213	197 / 199	186 / 206	247 / 247	212 / 218	201 / 201	186 / 188	226 / 234	2	2	0.2
	Ms121	233 / 233	253 / 259	213 / 215	197 / 199	186 / 206	247 / 247	212 / 216	199 / 199	186 / 192	226 / 232	82	82	6.4
Australia	Ms1	233 / 233	253 / 259	213 / 215	197 / 199	186 / 206	247 / 247	212 / 216	199 / 199	188 / 192	226 / 232	3	3	0.2
	Ms2	233 / 233	253 / 259	213 / 215	197 / 199	186 / 206	247 / 247	212 / 216	199 / 199	188 / 192	226 / 232	2	2	0.2

EU701746). The only available *M. sacchari* sequence from databases was from a specimen collected in India on sorghum, retrieved from Genbank (HQ112185) and added to the analysis. A sequence from *Melanaphis donacis* retrieved from Genbank (referenced HQ443314) was also added. A statistical parsimony network of haplotypes was constructed with the TCS 1.21 software (Clement *et al.*, 2000).

Morphometric data

Identification of *sacchari* and *sorghii* individuals was performed among 222 individuals from 21 samples, using the criteria from Blackman and Eastop (2006) based on the relative length of antennal terminal process (ANT PT) to length of hind tibia (LHT). According to this key, LHT ranging between 2.0 – 3.0 x ANT PT indicated the *sorghii* form. LHT ranging between 1.4 – 2.2 x ANT PT indicated the *sacchari* form. Measures were carried out using a binocular lens equipped with a micrometric ocular on aphids that were not slide-mounted, to allow posterior genotyping with microsatellite loci. The LHT / ANT PT ratio was calculated for each individual. Significance of the differences of mean ratio value averaged by microsatellite genotype was tested with an ANOVA and a Student-Newman-Keuls multiple range test carried out with SAS procedure GLM (SAS Institute, 2008).

Microsatellite PCR:

According to their polymorphism, ten microsatellite loci (**Tab. 2**) were selected among the fourteen previously developed by our team for *M. sacchari* (Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium *et al.*, 2010). PCR reactions were performed with labelled primers and multiplexed into two mixes (Qiagen type-it, standard procedure), and the following thermocycling protocol was used: denaturation at 95°C for 15 min, 25 cycles consisting of 30 s of denaturation at 94°C, 1 min 30 s of annealing at 54°C, and 30 s of elongation at 72°C. We used an ABI prism 3110 (Applied Biosystems) for genotyping after

addition of an internal size standard for each sample (GeneScan LIZ 500, Applied Biosystems). Allele identification at each locus was performed by comparison with the size standard using the Genemapper version 2.5 software (Applied Biosystems).

A total of 1288 individuals were genotyped, including the 222 that were used for morphometry. The microchecker software (Van Oosterhout *et al.*, 2004) was run on the whole population. No evidence for the presence of null alleles was found.

Microsatellite analyses

Single combination of alleles were retrieved from genotyping data and arranged as unique multilocus genotypes (MLGs). Due to great difference in allele frequencies among populations at the worldwide scale, some analyses were performed on the whole set of individuals, and others using only one individual per MLG, as suggested by Sunnucks *et al.* (1997). The diversity index ($e^{(H)}$), derived from the Shannon index, was calculated for each region (Vanoverbeke, De Meester, 1997). It provides an estimation of clonal diversity regardless of the number of aphids assayed, which allowed us to take into account sampling irregularities between regions.

Population genetics parameters were computed on the whole dataset with functions implemented in the Genetix software (Belkhir *et al.*, 2004). We computed mean number of alleles per locus, tested departures from HWE by calculating expected and observed heterozygosity, and calculated by-population FIS values according to Weir and Cockerham (1984). Linkage disequilibrium was computed between all pairs of loci for individual regions, and for the whole worldwide set. Molecular analysis of variance (AMOVA) from the software Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) was used to study the effect of regions and host plant (sorghum vs. sugarcane) on the genotypic diversity of aphid populations. They were carried out separately on *sorghi* and *sacchari* individuals. Samples from Kenya, where both forms

Table 1. Relative length of antennal terminal process (LPT / LHT ratio = length of antennal terminal process / length of hind tibia) for the five most frequent MLGs. Affection of each MLG to a COI group is inferred from Fig. 1.

COI group	MLG	sample	mean LPT / LHT ratio ^a	range	± 95% confidence interval	sample size
A	Ms1	Aus1	1.67	[1.4 – 2.0]	0.05	9
		Aus2	1.59	[1.4 – 1.8]	0.06	18
		Ms1 mean	1.6 c	[1.4 – 2.0]	0.05	27
	Ms3	Ben1	1.9	[1.6 – 2.0]	0.08	10
		Ben3	2.0	[1.6 – 2.5]	0.18	10
		Cam2	2.4	[2.1 – 3.3]	0.28	7
		Cam3	2.0	[1.8 – 2.2]	0.05	21
		Ken1	2.0	n.c.	-	1
		Ken5	2.2	[1.9 – 2.5]	0.15	7
		Nig1	1.9	[1.6 – 2.4]	0.36	4
		Ms3 mean	2.1 a	[1.6 – 3.3]	0.06	71
B1	Ms9	Haw1	1.6	[1.3 – 1.9]	0.12	10
		Haw3	1.4	[1.2 – 1.8]	0.10	10
		Lou4	1.6	[1.5 – 1.9]	0.08	9
		Lou6	1.7	[1.6 – 1.8]	0.03	17
		Lou7	1.7	[1.6 – 1.9]	0.05	10
		Ms9 mean	1.6 c	[1.2 – 1.9]	0.04	56
B2	Ms11	Bra1	1.8	[1.5 – 2.1]	0.13	7
		Gua5	1.7	[1.4 – 2.1]	0.12	10
		Ken1	1.8	[1.7 – 1.9]	0.06	8
		Mau1	1.8	[1.5 – 2.4]	0.10	17
		Ms11 mean	1.8 b	[1.4 – 2.4]	0.06	42
	Ms16	Run1	1.7	[1.4 – 2.1]	0.12	8
		Run2	1.8	[1.6 – 1.9]	0.07	8
		Run7	1.8	[1.6 – 1.9]	0.06	10
		Ms16 mean	1.7 b	[1.4 – 2.1]	0.06	26

^a mean values followed by the same letter are not significantly different ($P > 0.05$) by a Student-Newman-Keuls multiple range test.

were mixed, were excluded from analysis. Analysis of host-plant effect was carried out only with samples from geographic regions where both sorghum and sugarcane had been sampled. Posterior Bayesian assignment with the Structure software (Pritchard *et al.*, 2000) was performed on microsatellite data to separate individuals into different clusters. The Markov chains were run assuming an admixture model with correlated allele frequencies. Tests were carried with a burn-in period of 200 000 replications, and a similar number of generation. We used the method described in Evanno et al (2005) to determine the best suitable number of clusters for population structure.

The relatedness between genotypes was evaluated with the DARwin software (Perrier *et al.*, 2003), by drawing a NJ tree (Saitou, Nei, 1987) from a dissimilarity matrix computed with the shared allele distance D_{AS} (Jin, Chakraborty, 1994). As recommended by Sunnucks et al. (1997), these tests have been performed using a single individual for each multilocus genotype, to avoid misinterpretation such as Wahlund effect, and to compensate the differences in the number of aphids sampled in each geographical region.

Results

Morphometric data

Analysis of morphometric data are presented in **table 1**. A bivariate plot of these data is also presented in **Supp. Fig. 1**. Data were averaged by microsatellite MLG, representing the five most frequent MLGs (see below and **Tab. 2**). Statistical analysis of the relative length of antennal terminal process (ANT PT) revealed discontinuities and showed that individuals from Ms3 had a shorter antennal terminal process than the four other MLGs. The four other MLGs formed two groups, with the group Ms1 and Ms9 having significantly longer relative length of ANT PT than the group formed by Ms11 and Ms16.

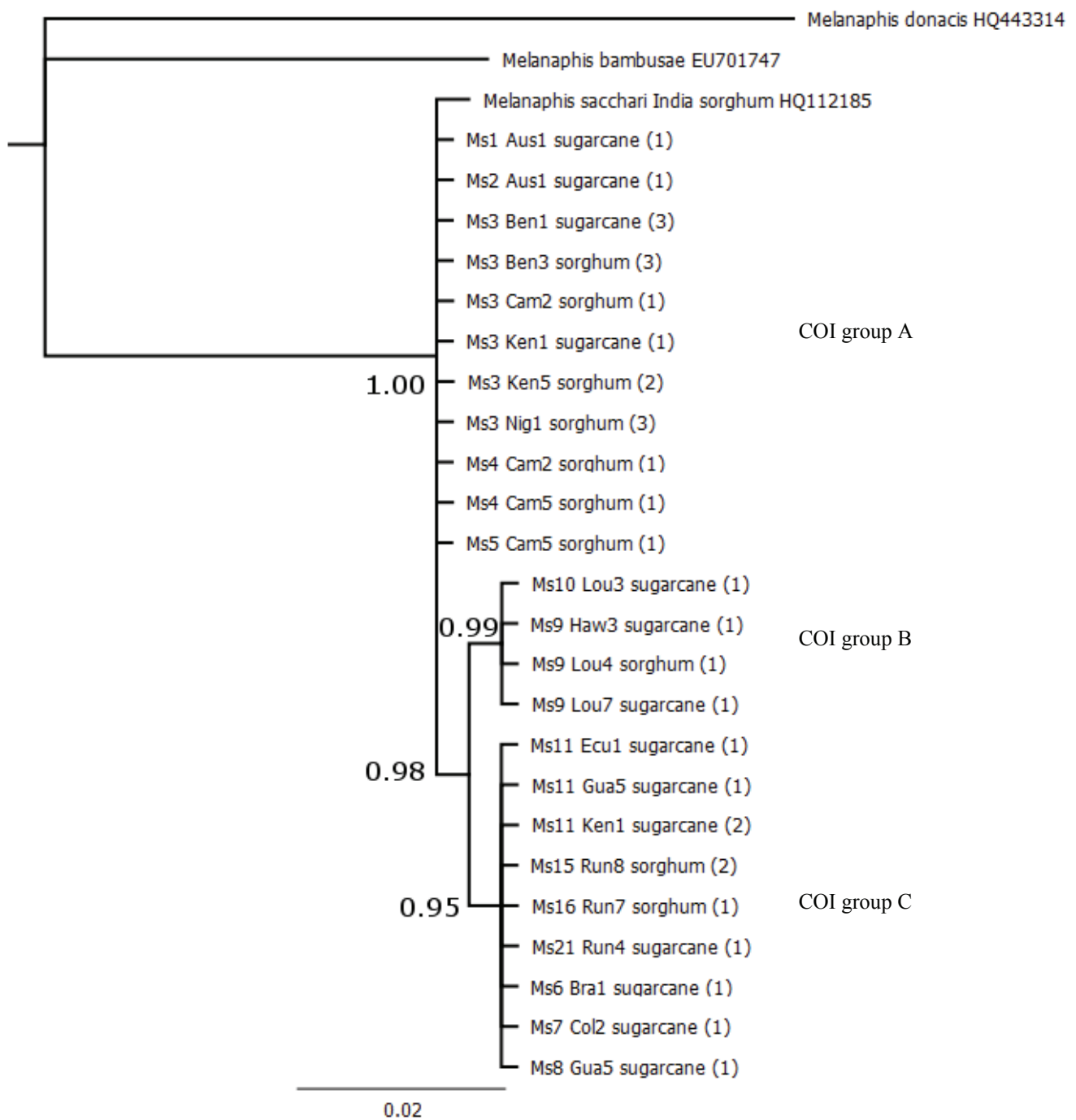


Figure 1. Bayesian phylogenetic tree built from a 658bp excerpt of the Cytochrome Oxydase 1 (COI) barcoding region. Numbers at the nodes indicate Bayesian posterior probabilities (GTR Nucleotide substitution model with equal rate of variation across sites) calculated from MrBayes. Ms indicate microsatellite Multi Locus Genotype, according to Tab. 3. Samples are identified according to Tab. 1. Numbers under brackets indicate the number of identical sequences obtained from the same MLG x sample combination.

According to Blackman and Eastop (2006), these results suggested that individuals belonging to MLG Ms3 belonged to the *sorghi* form (hind tibia = 2.0 – 3.0 x ANT PT), while Ms1, Ms9, Ms11 and Ms16 belonged to the *sacchari* form (hind tibia = 1.4 – 2.2 x ANT PT). Nevertheless, with a mean ratio of 2.1, Ms3 was in the overlapping area between both forms.

COI sequence data

The phylogenetic tree was built from a 658 bp fragment of the COI barcoding region, using the GTR nucleotide substitution model with equal rate of variation across sites (**Figure 1**). Variation among individual sequences was very low. Only four distinct haplotypes and four nucleotide substitutions were observed, when taking into account the *M. sacchari* Genbank sequence from India. Maximum sequence divergence between two haplotypes was three substitutions (0.46 %) and occurred between group A and group B or C. Sequence variations peaked at 0.3 % (2 substitutions among 658 bp) for the most distant individuals from our sample, excluding the Indian sequence from Genbank. Individuals were dispatched into three groups, which were supported by strong probabilities at the internodes (**Fig. 1**). Group A was made up of individuals from Africa, India and Australia. Group C was comprised of individuals from South America, Caribbean, Reunion and Kenya. Hawaii and Louisiana individuals were inferred to group B, which was a sister-group of C. Individuals collected from both sorghum and sugarcane were present in each of the three groups. The haplotype parsimony network showed that each of the three haplotypes observed in our study derived separately from a single unobserved one (**Supp. Fig. 3**).

Individuals grouped in group A belonged to microsatellite MLGs Ms1, Ms2, Ms3, Ms4 and Ms5. Individuals from group B belonged to MLGs Ms9 and Ms10. Individuals from group C belonged to MLGs Ms6 to Ms8, Ms11, Ms15 and Ms21. According to morphometric data,

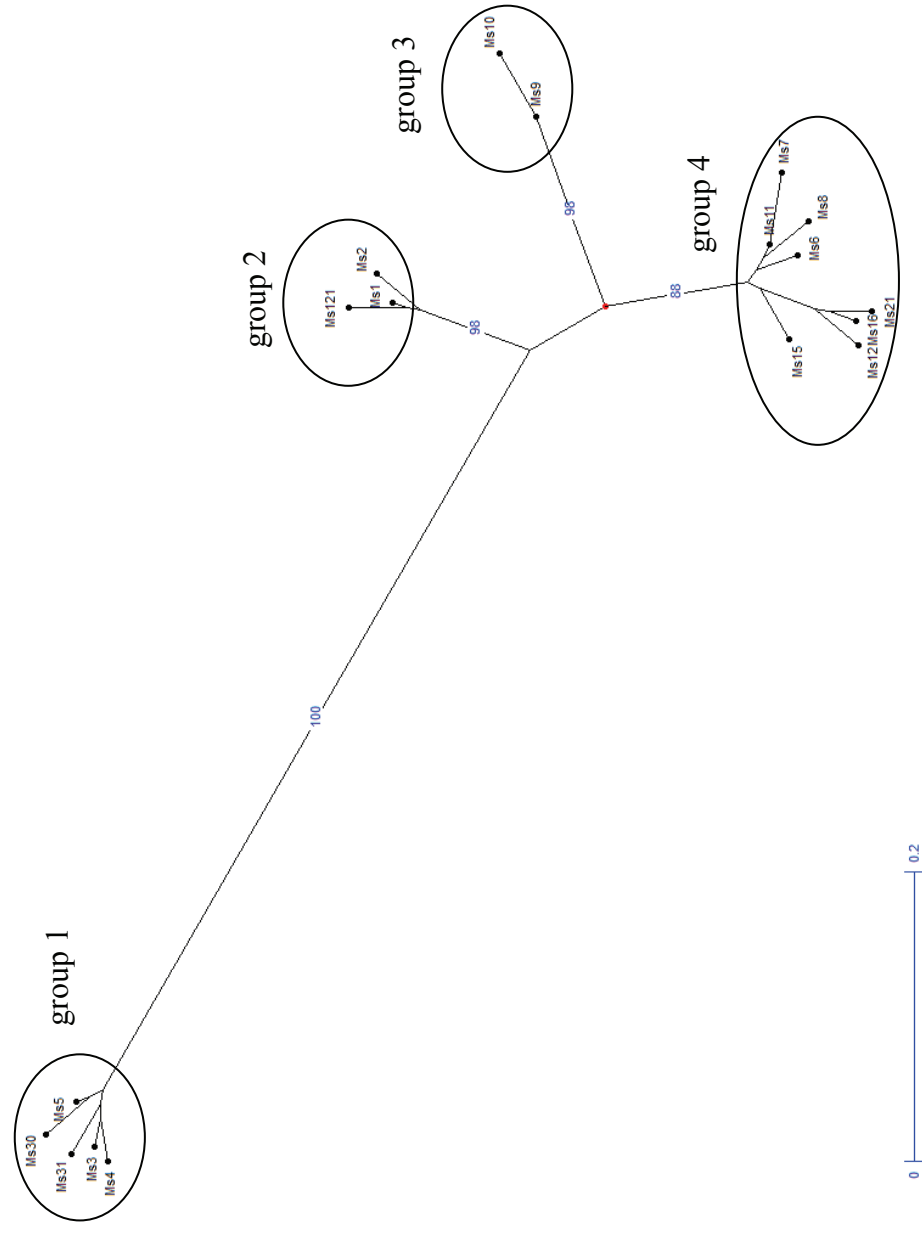


Figure 4. NJ tree from simple matching dissimilarity matrix computed by Darwin software with microsatellite data. Bootstrap values > 0.8 are represented (10,000 replications).

group A contained simultaneously a MLG identified as a *sorghii* form (Ms3) and a MLG identified as a *saccharii* form (Ms1).

Microsatellite data

All of the samples differed significantly from Hardy-Weinberg equilibrium, with a heterozygote excess at all loci (**Suppl. Tab. 2**) demonstrated by FIS values that were strongly negative, and equal or very close to -1. Significant ($P < 0.001$) linkage disequilibria were observed in 30 of 43 pairs of loci when computing LD with one representative per MLG. Diversity index values, accounting for allelic diversity, were very low, with values typically ranging between one and three for most countries (**Figure 2**). Allelic diversity per locus ranged between 1.4 and 1.8.

Genetic diversity was low at the worldwide scale, with 18 MLGs found on the whole population of 1288 aphids (**Tab. 2**). African individuals, with the exception of Ms11 individuals observed in Kenya, exhibited a null allele at locus CIR-Ms-G02. Five MLGs (Ms1, Ms3, Ms9, Ms11, and Ms16) represented 87 % (1119 / 1288) of individuals, and most regions displayed only one MLG (**Fig. 2**). The most frequent MLG, Ms11, accounted for 26% (334 / 1288) of the worldwide sample, and was found in 8 of the 14 regions. Ten out of fourteen regions did not show more than two MLGs, even when a large number of individuals were sampled (e.g. Louisiana: 239, Benin: 122). Most regions, including Australia, Louisiana, Hawaii or African samples, comprised a main genotype accounting for the majority of aphids sampled, with one or two additional genotypes, deriving from the main one by a step mutation or a private allele at one or two loci (**Fig. 2 and Tab. 2**).

According to the Δk method (Evanno *et al.*, 2005), posterior Bayesian assignment of MLGs with the Structure software supported a clustering with a pattern of two subgroups (**supp. Fig 2**). Structuring in two cluster showed (**Fig. 3**) a separation of the individuals between a group

Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) comparing genetic variation in microsatellite data for either *sacchari* (A) or *sorghii* (B) aphid samples between host-plants (sorghum vs. sugarcane) or between regions (AU = Australia, BR = Brazil, CO = Columbia, EC = Ecuador, GP = Guadeloupe, HI = Hawaii, LA = Louisiana, MQ = Martinique, MU = Mauritius, RE = Reunion, BJ = Benin, CM = Cameroon, NE = Niger).

Model	Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	Fixation indices	P-value
<i>A. sacchari</i> form							
A.1. Host-plants (sorghum vs. sugarcane)	Among host-plants	1	23.3	-0.01	-0.65	-0.01 F_{CT}	> 0.05
	Among populations within host-plant	14	389.4	0.48	22.6	0.22 F_{SC}	< 0.01
	Within populations	862	1420.5	1.65	78.0	0.22 F_{ST}	< 0.01
A.2. Regions (AU, BR, CO, EC, GP, HI, LA, MQ, MU, RE)	Among regions	9	919.5	0.62	27.6	0.28 F_{CT}	< 0.01
	Among populations within regions	26	50.4	0.01	0.29	< 0.01 F_{SC}	< 0.01
	Within populations	1698	2761.8	1.63	72.1	0.28 F_{ST}	< 0.01
<i>B. sorghi</i> form							
B.1. Host-plants (sorghum vs. sugarcane)	Among host-plants	1	0.02	0	0	0 F_{CT}	> 0.05
	Among populations within host-plant	2	0.16	-0.01	-1.6	-0.02 F_{SC}	< 0.05
	Within populations	234	241.8	1.03	101.6	-0.02 F_{ST}	< 0.05
B.2. Regions (BJ, CM, NE)	Among regions	2	1.45	-0.01	-0.46	-0.01 F_{CT}	> 0.05
	Among populations within regions	8	13.5	0.01	1.04	0.01 F_{SC}	< 0.01
	Within populations	607	640.2	1.05	99.4	0.01 F_{ST}	< 0.01

containing exclusively MLGs observed in Africa (Ms3, Ms4, Ms5, Ms30, Ms31), and a group with the rest of the samples. MLG belonging to the *sacchari* form (Ms1, Ms9, Ms11, Ms16) were in cluster2, while the *sorghum* form MLG Ms3 was in cluster 1. Structure tests without individuals from the five Africa-restricted genotypes (Ms3, Ms30, Ms31, Ms4 and Ms5) detected no additional clustering as no clustering pattern was more likely than another (data not shown).

The NJ tree for simple matching (**Fig. 4**) revealed four groups supported by high bootstrap values. Strong geographic structuring appeared in these NJ tree groups: group 1 was restricted to Africa, group 2 to Australia, group 3 to the USA, and group 4 grouped samples from the rest of the world including Kenya. Kenya populations were an exception to this geographic structuring: one sample (eight individuals) from sorghum from the inner territory, only featured the African *sorghum* Ms3 genotype from group 1, and three other populations sampled on sugarcane the coastal side of the country, featured a mix between few Ms3 individuals (2 %) and a large majority of the worldwide common *sacchari* genotype Ms11 (98 %) from group 4.

AMOVA confirmed the geographic structuring in the distribution of MLG belonging to the *sacchari* form (**Tab. 3**). Effect of geographical region of origin of *sacchari* samples on their genotypic diversity was significant. On the other hand, no significant geographic structuring was detected for *sorghum* individuals, which were restricted to Western Africa in our sample. Host plant effect was tested after reducing the sample to the regions featuring sampling from both sugarcane and sorghum. Host plant effect was significant neither for *sacchari* nor for *sorghum* individuals.

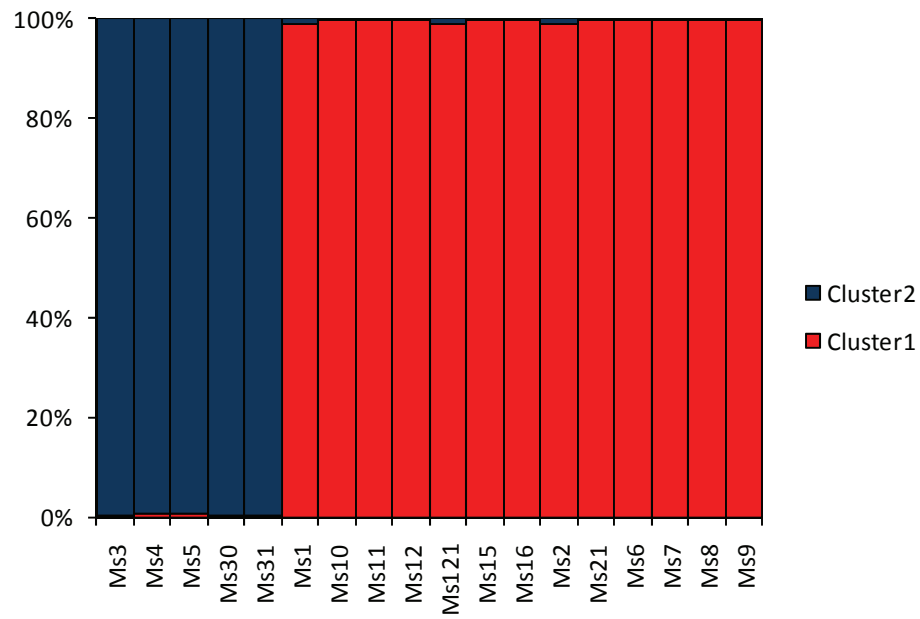


Figure 3. Plotting of posterior Bayesian assignment of the 18 multilocus genotypes, from the Structure software.

Discussion

The present study had two main purposes: clarify the taxonomic situation between the two forms previously described, and study the genetic structure of populations at the worldwide scale.

Morphometric data confirmed the existence of a morphological discontinuity associated with geographical location, coherent with the presence of the two taxa *M. sacchari* and *M. sorghi*.

According to Blackmann et al (1990), the *sacchari* is present worldwide while *sorghi* is observed in Africa and continental Asia. Due to lack of sample, we could not verify the coexistence of both taxa in Asia, but we detected this coexistence in Kenya. Sequencing the COI 'barcoding' region, a typical locus used for species discrimination and phylogeny (Hajibabaei et al., 2007), notably in aphids (Coeur d'acier et al., 2007; Kim, Lee, 2008), did not allow a clear separation between both taxa. Individuals from seven populations sampled in Africa and identified as *M. sorghi*, according to morphometry, shared the same COI haplotype with individuals from a population sampled in Australia and identified as *M. sacchari*. Some cases of failure to distinguish aphid species using COI sequences have already been observed in the Aphididae family (Lee et al., 2011) and in the Adelgidae family (Žurovcova et al., 2010). We found COI sequence variations peaking at 0.46 % if we take into account the whole dataset including the *M. sacchari* sequence from India available from Genbank. This value was identical to the lowest interspecific divergence observed by Footit et al. (2008) within the Aphidae family. In a more recent work in the Aphididae family, Lee et al. (2011) described 20 species pairs with average interspecific divergence lower than 0.46%. Therefore, neither the low sequence divergence that we observed between *M. sacchari* and *M. sorghi*, nor the absence of divergence between *sorghi* individuals from MLG Ms3 and *sacchari* individuals from MLG Ms1, was incompatible with the existence of two distinct

taxa. The existence of two separated taxa was also reinforced by the fact that the strongest divergence in microsatellite data was observed between *sorghii* and *sacchari* individuals, and notably illustrated by the presence of a null allele in the locus CIR-Ms-G02 for *sorghii* individuals. No divergent host plant association was noticed between both taxa, as both of them were indifferently collected on sorghum and sugarcane. Therefore, our study did not allow a clear conclusion regarding the taxonomic relationship between both taxa. Although the morphometry data confirmed a discontinuity between both taxa associated with the geographical location, the apomictic nature of the reproduction of these aphids prevents to consider the two forms *sacchari* and *sorghii* as subspecies (Blackman, Eastop, 2007). Further exploration of this taxonomic issue should include sample from eastern Asia, the presumed area of origin of the *M. sacchari* group. At the current level of knowledge, *sorghii* and *sacchari* can still be considered as two individualized forms, so that research relating specifically to each of the distinct forms can be easily accessed in the future (R. Blackman, pers. comm.).

Our study allowed to get an insight in the mode of reproduction prevailing in the *Melanaphis sacchari* group. As related by Blackman and Eastop (2006), populations were widely clonal, with very low intra-population variability, reflected by low values of Shannon-derived index $e^{(H)}$. Population genetic parameters were consistent with population strictly reproducing by apomictic parthenogenesis. Every population significantly differed from Hardy-Weinberg equilibrium, with a strong heterozygote excess, and frequent linkage disequilibrium was observed between loci. All these features are a common consequence of populations undergoing clonal reproduction for a long time (Halkett *et al.*, 2005). This demonstrated that sexual admixture has not occurred in any of the geographical places sampled, as departure from strict clonality leads to a high variance in F_{IS} values (Balloux *et al.*, 2003) and higher levels of diversity (Halkett *et al.*, 2005), which was not observed in this study. It could be

discussed whether sexual admixture does occur in *M. sacchari*, or if this species has ancestrally lost the ability to reproduce. In a worldwide genetic diversity study carried out on *Aphis gossypii*, Carletto et al. (2009) obtained results similar to ours as they observed a low genetic diversity, with the predominance of few clones at the worldwide scale reproducing by exclusive apomictic parthenogenesis. But more recently, Razmjou et al. (2010) obtained evidence of sexual reproduction of *A. gossypii* in Iran and hypothesized that Middle East may thus represent a source of genotypic variation for this species. This illustrates that sexual admixture may still exist in local population even in a species highly clonal at the worldwide scale. The presence of holocycle has been observed in the *M. sacchari* group in Asia (Blackman, Eastop, 2000) and this suggests that a higher genetic diversity could exist in some parts of its geographic distribution area.

Microsatellite analyses showed that population structuring at the worldwide scale was only influenced by geography, delimiting four groups corresponding to four geographic zones: a first group represented by the *sorghi* form observed in Western Africa, and three groups belonging to the *sacchari* form in (i) Australia, (ii) USA, (iii) Indian Ocean (including Kenya) – South America -Caribbean. Variation within each of these four zones was very low and populations were highly clonal, with most MLGs observed within a zone deriving from a main MLG by a step mutation or one or two private alleles, which we suggest would be due to a single or few events of introduction. In each of the three zones colonized by the *sacchari* form, a distinct COI haplotype was observed, and each of these three haplotypes derived separately by a single substitution from a single unobserved haplotype. These results, both COI sequence and microsatellite diversity, suggested that each of the four zones have been colonized separately following introductions of one or few clones from the origin region of the *M. sacchari* group, most likely Asia. In the USA, individuals sampled in Louisiana and Hawaii belonged mainly to the same MLG, Ms9, which was never observed in other regions.

Records of *Melanaphis sacchari* in Hawaii state that this species has been described since the late 19th century (Zimmermann, 1948). *Melanaphis sacchari* has only been recorded in continental USA in the end of the 70's in Florida (Mead, 1978) and in 2001 in Louisiana (White *et al.*, 2001). This suggests that *M. sacchari* has been introduced in Florida and Louisiana from Hawaii. In the Indian Ocean – South America – Caribbean zone, the Ms11 genotype represented 57% of the individuals genotyped in this vast zone and therefore suited the pattern of a single genotype that would have spread around the world. The chronology of this expansion cannot be described with precision, as available references only mention the introduction of *M. sacchari* in South America about 1932 (Blackman, Eastop, 2000). This particular invasive Ms11 genotype could fit along the concept of “superclone” (Vorburger *et al.*, 2003) characterized by a geographical and ecological widespread distribution and documented in several aphid species (Figuerola *et al.*, 2005; Llewellyn *et al.*, 2003; Zepeda-Paulo *et al.*, 2010). In Kenya, Ms11 was observed in three samples from the coastal region of the country and was absent in a sample from the inland. These observations could suggest that the expansion of Ms11 is still under progress and that this genotype could spread in Africa or in other areas like USA in the future and eventually overcome locally present genotypes. Even though *M. sacchari* has been recorded in almost any cultivated area of sugarcane, the possibility for the expansion of some genotypes has to be taken seriously, mainly regarding the unknown potential impact on the epidemiology of viral diseases it transmits.

Conclusion

This study highlights one of the most important issues in modern crop protection, which is dealing with emerging pests in the context of growing durable resistances. In particular, species with a high adaptative potential constitute a real challenge for the selection of

sustainable genetic resources, as illustrated by several examples of resistance factors overcome by invasive genotypes of previously controlled pests . Recent studies have begun to focus on sources of resistance to *M. sacchari* in sugarcane (Akbar *et al.*, 2010), mostly because it is now considered a serious threat, as it is an efficient vector of several sugarcane viruses. In the present case, our main observation is that *M. sacchari* has a highly adaptative potential, as illustrated by the outstanding spreading of a single genotype observed at the worldwide scale.

Aknowledgements

The authors would like to thank every person involved in the gathering of the worldwide aphid collection: T. Martin (Benin), T. Brévault (Cameroon), A. Ratnadass (Niger), J.-F. Martiné (Kenya), P. Samson and R. Goebel (Australia), P. Silvie and M. V. Sampaio (Brazil), J.-H. Daugrois (Caribbean), W. White (Louisiana), S. Ganeshan (Mauritius), D. Gualle (Ecuador), J.-C. Girard (Columbia), S. Schenk (Hawaii), R. Tibère (Reunion). This work was funded by CIRAD, by the Conseil Régional de La Réunion and by the European Union: European Agricultural Guidance and Guarantee Fund (EAGGF).

References

- Akbar W, Showler AT, Reagan TE, White WH (2010) Categorizing sugarcane cultivar resistance to the sugarcane aphid and yellow sugarcane aphid (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* **103**, 1431-1437.
- Balloux F, Lehmann L, de Meeus T (2003) The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics* **164**, 1635-1644.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Blackman RL, Eastop VF (2000) *Aphids of the world crops: an identification and information guide, 2nd edition* John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.
- Blackman RL, Eastop VF (2006) *Aphids on the world's herbaceous plants and shrubs* John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.
- Blackman RL, Eastop VF (2007) Taxonomic issues. In: *Aphids as crop pests* (eds. Van Emden H, Harrington R), pp. 1-29. CAB International, Wallingford, UK.
- Blackman RL, Eastop VF, Brown PA (1990) The biology and taxonomy of the aphids transmitting *Barley yellow dwarf virus*. In: *World Perspectives on Barley Yellow Dwarf International Workshop* (ed. Burnett PA), pp. 197-214. CIMMYT, Udine (Italy).
- Caillaud CM, Dedryver CA, Di Pietro JP, *et al.* (1995) Clonal variability in the response of *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae) to resistant and susceptible wheat. *Bulletin of Entomological Research* **85**, 189-195.
- Carletto J, Lombaert E, Chavigny P, *et al.* (2009) Ecological specialization of the aphid *Aphis gossypii* Glover on cultivated host plants. *Molecular Ecology* **18**, 2198-2212.

415 Clement M, Posada D, Crandall K (2000) TCS: a computer program to estimate gene
 416 genealogies. *Molecular Ecology* **9**, 1657-1659.

417 Coeur d'acier A, Jouselin E, Martin J-F, Rasplus J-Y (2007) Phylogeny of the Genus *Aphis*
 418 Linnaeus, 1758 (Homoptera: Aphididae) inferred from mitochondrial DNA sequences.
 419 *Molecular Phylogenetics and Evolution* **42** 598-611.

420 Dogimont C, Bendahmane A, Chovelon V, Boissot N (2010) Host plant resistance to aphids
 421 in cultivated crops: Genetic and molecular bases, and interactions with aphid
 422 populations. *Comptes Rendus Biologies* **333**, 566-573.

423 ElSayed A, Weig A, Komor E (2011) Molecular characterization of Hawaiian *Sugarcane*
 424 *yellow leaf virus* genotypes and their phylogenetic relationship to strains from other
 425 sugarcane-growing countries. *European Journal of Plant Pathology* **129**, 399-412.

426 Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using
 427 the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.

428 Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package
 429 for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50.

430 Figueroa CC, Simon JC, Le Gallic JF, *et al.* (2005) Genetic structure and clonal diversity of
 431 an introduced pest in Chile, the cereal aphid *Sitobion avenae*. *Heredity* **95**, 24-33.

432 Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of
 433 mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates.
 434 *Molecular marine biology and biotechnology* **3**, 294-299.

435 Footitt RG, Maw HEL, von Dohlen CD, Hebert PDN (2008) Species identification of aphids
 436 (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Molecular Ecology*
 437 *Resources* **8**, 1189-1201.

438 Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PDN, Hickey DA (2007) DNA barcoding: how it
 439 complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in*
 440 *Genetics* **23**, 167-172.

441 Halkett F, Simon J-C, Balloux F (2005) Tackling the population genetics of clonal and
 442 partially clonal organisms. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 194-201.

443 Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees.
 444 *Bioinformatics* **17**, 754-755.

445 Jin L, Chakraborty R (1994) Estimation of genetic distance and coefficient of gene diversity
 446 from single-probe multilocus DNA fingerprinting data. *Molecular Biology and*
 447 *Evolution* **11**, 120-127.

448 Katis N, Tsitsipis J, Stevens M, Powell G (2007) Transmission of plant viruses. In: *Aphids as*
 449 *crop pests* (eds. van Emden H, Harrington R), pp. 353-390. CAB International,
 450 Wallingford, UK.

451 Kim H, Lee S (2008) A molecular phylogeny of the tribe Aphidini (Insecta: Hemiptera:
 452 Aphididae) based on the mitochondrial tRNA/COII, 12S/16S and the nuclear EF1 α ;
 453 genes. *Systematic Entomology* **33**, 711-721.

454 Lee W, Kim H, Lim J, *et al.* (2011) Barcoding aphids (Hemiptera: Aphididae) of the Korean
 455 Peninsula: updating the global data set. *Molecular Ecology Resources* **11**, 32-37.

456 Lehrer A, Wu K, Komor E (2009) Impact of Sugarcane yellow leaf virus on growth and sugar
 457 yield of sugarcane. *Journal of General Plant Pathology* **75**, 288-296.

458 Llewellyn KS, Loxdale HD, Harrington R, *et al.* (2003) Migration and genetic structure of the
 459 grain aphid (*Sitobion avenae*) in Britain related to climate and clonal fluctuation as
 460 revealed using microsatellites. *Molecular Ecology* **12**, 21-34.

461 Lombaert E, Carletto J, Piotte C, *et al.* (2009) Response of the melon aphid, *Aphis gossypii*, to
 462 host-plant resistance: evidence for high adaptive potential despite low genetic
 463 variability. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **133**, 46-56.
 464 Mead FW (1978) *Melanaphis sacchari* (Zehntner) - Florida - New Continental United States
 465 Record. *Cooperative Plant Pest Report* **3**.
 466 Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, Andris M, Aradottir GI, *et*
 467 *al.* (2010) Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources
 468 Database 1 June 2010 – 31 July 2010. *Molecular Ecology Resources* **10**, 1106-1108.
 469 Perrier X, Flori A, Bonnot F (2003) Data analysis methods. In: *Genetic diversity of cultivated*
 470 *tropical plants* (eds. Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC), pp. 43-76.
 471 Enfield, Science Publishers, Montpellier, France.
 472 Posada D, Buckley TR (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics:
 473 advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches over likelihood
 474 ratio tests. *Systematic Biology* **53**, 793-808.
 475 Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using
 476 multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
 477 Rassaby L, Girard JC, Letourmy P, *et al.* (2003) Impact of *Sugarcane yellow leaf virus* on
 478 sugarcane yield and juice quality in Réunion Island. *Eur j plant pathol* **109**, 459-466.
 479 Razmjou J, Vorburger C, Moharramipour S, Mirhoseini SZ, Fathipour Y (2010) Host
 480 associated differentiation and evidence for sexual reproduction in Iranian populations
 481 of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **134**,
 482 191-199.
 483 Remaudière G, Remaudière M (1997) *Catalogue of the world's Aphididae* INRA, Paris,
 484 France.

485 Rott P, Mirkov TE, Schenck S, Girard JC (2008) Recent advances in research on *Sugarcane*
486 *yellow leaf virus*, the causal agent of sugarcane yellow leaf. *Sugar Cane International*
487 **26**, 18-27.

488 Saitou N, Nei M (1987) The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing
489 phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.

490 SAS Institute (2008) *SAS OnlineDoc® 9.2* SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

491 Schenck S, Lehrer AT (2000) Factors affecting the transmission and spread of *Sugarcane*
492 *yellow leaf virus*. *Plant-Disease* **84**, 1085-1088.

493 Singh BU, Padmaja PG, Seetharama N (2004) Biology and management of the sugarcane
494 aphid, *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Homoptera: Aphididae), in sorghum: a
495 review. *Crop Protection* **23**, 739-755.

496 Sunnucks P, Barro PJD, Lushai G, MacLean N, Hales D (1997) Genetic structure of an aphid
497 studied using microsatellites: cyclic parthenogenesis, differentiated lineages and host
498 specialization. *Molecular Ecology* **6**, 1059-1073.

499 Sunnucks P, Hales D (1996) Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome
500 oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Mol Biol Evol* **13**,
501 510-524.

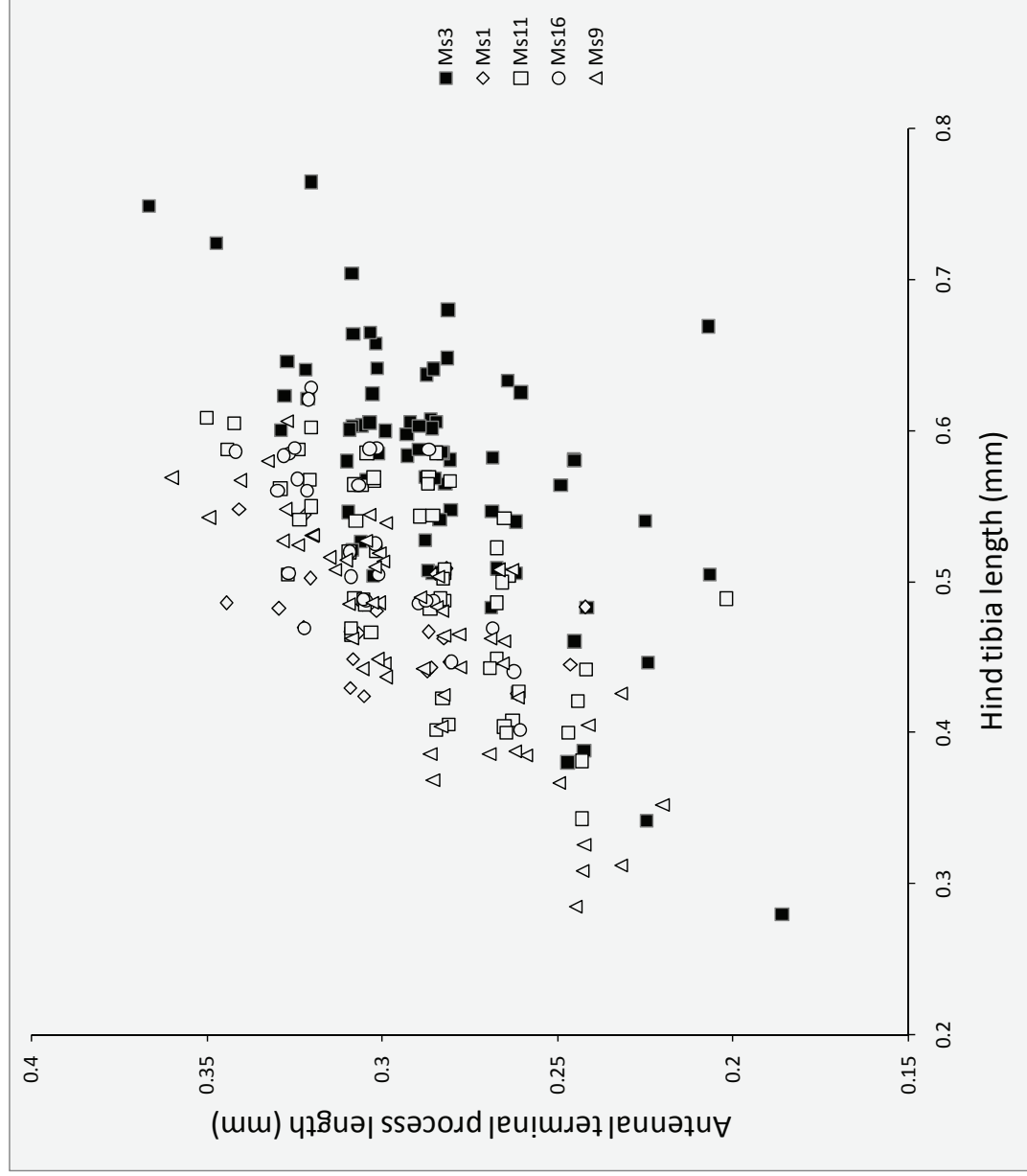
502 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics
503 Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596-
504 1599.

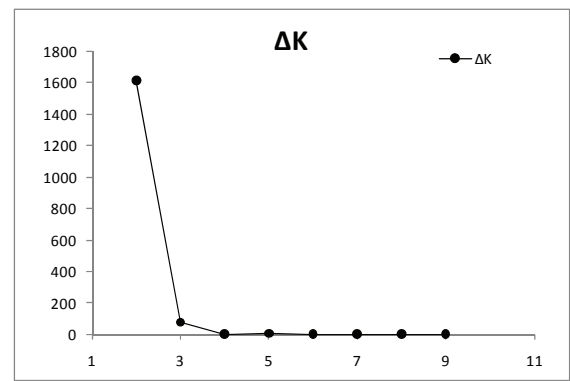
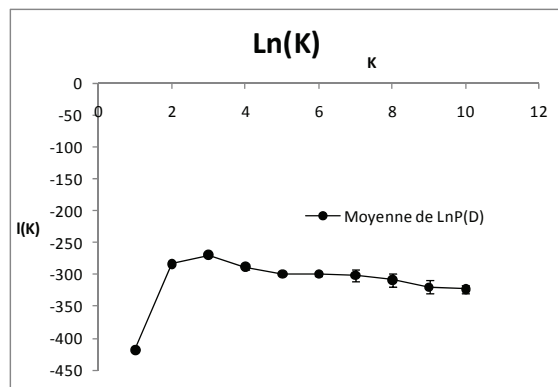
505 van Emden H (2007) Host-plant resistance. In: *Aphids as crop pests* (eds. van Emden H,
506 Harrington R), pp. 447-468. CAB International, Wallingford, UK.

507 Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley S (2004) micro-checker: software
508 for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular*
509 *Ecology Notes* **4**, 535-538.

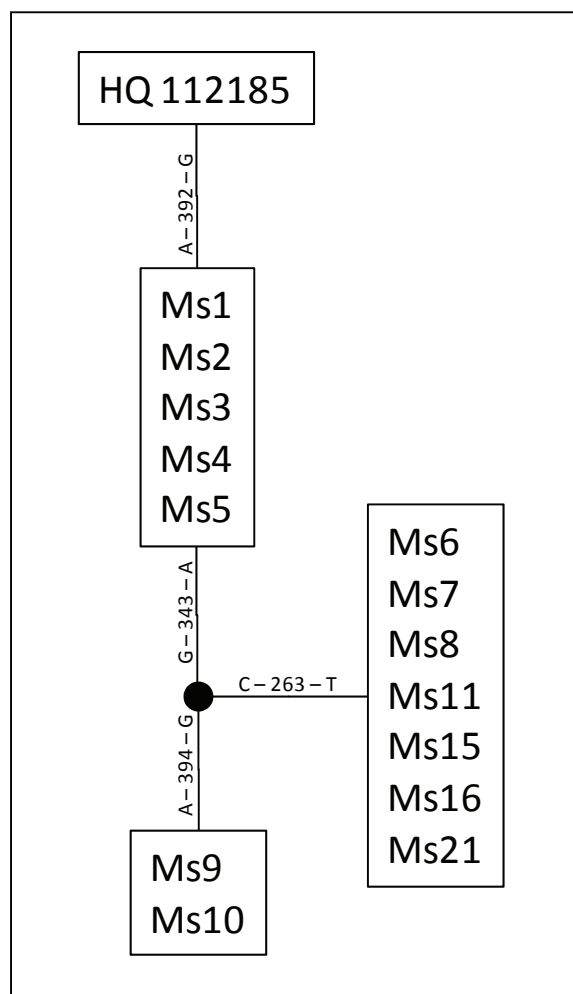
510 Vanoverbeke J, De Meester L (1997) Among-population genetic differentiation in the
 511 cyclical parthenogen *Daphnia magna* (Crustacea, Anomopoda) and its relation to
 512 geographic distance and clonal diversity. *Hydrobiologia* **360**, 135-142.
 513 Vorburger C, Lancaster M, Sunnucks P (2003) Environmentally related patterns of
 514 reproductive modes in the aphid *Myzus persicae* and the predominance of two
 515 'superclones' in Victoria, Australia. *Molecular Ecology* **12**, 3493-3504.
 516 Weir B, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure.
 517 *Evolution* **38**, 1358-1370.
 518 Westwood JH, Stevens M (2010) Resistance to Aphid Vectors of Virus Disease. In: *Advances*
 519 *in Virus Research* (eds. John PC, Gad L), pp. 179-210. Academic Press.
 520 White WH, Reagan TE, Hall DG (2001) *Melanaphis sacchari* (Homoptera: Aphididae), a
 521 sugarcane pest new to Louisiana. *Florida Entomologist* **84**, 435-436.
 522 Zepeda-Paulo FA, Simon JC, Ramírez CC, *et al.* (2010) The invasion route for an insect pest
 523 species: the tobacco aphid in the New World. *Molecular Ecology* **19**, 4738-4752.
 524 Žurovcova M, Havelka J, Sary P, *et al.* (2010) "DNA barcoding" is of limited value for
 525 identifying adelgids (Hemiptera: Adelgidae) but supports traditional morphological
 526 taxonomy. *Eur. J. Entomol.* **107**, 147-156.
 527

Supplementary Figure 1. Bivariate plot of length of antennal terminal process to length of hind tibia for 222 aphids, according to their microsatellite Multi Locus Genotype.





Supplementary Figure 2. Plotting of likelihood of k value from the analysis of microsatellite data with the Structure software (left) and of Deltak from the Evanno method (right).



Supplementary Figure 3. Parsimony network of COI haplotypes constructed with TCS based on sequence from 25 individuals. Each box represents a distinct haplotype. Ms within boxes are microsatellite MLG of individuals carrying the considered COI haplotype. Location and nature of substitutions are mentioned on the branches. The black dot represents an unobserved haplotype. HQ112185 is a sequence from *M. sacchari* from India retrieved from Genbank.

Sample	Region	Location	Date of sampling	Host plant (com.)	Host plant (sci.)	sample size
Lou7	Louisiana	Terrebonne	October-07	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	32
Lou8	Louisiana	Terrebonne	October-07	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	31
Mar1	Martinique	Fort de France Coridon	June-09	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	6
Mar2	Martinique	Fort de France Coridon	June-09	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	21
Mar3	Martinique	Fort de France Moutte	June-09	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	15
Mau1	Mauritius	Rednit	June-09	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	29
Nig1	Niger	Niamey	November-07	sorghum	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	21
Nig2	Niger	Niamey	November-07	sorghum	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	13
Run1	Reunion	Sainte Marie	June-07	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	15
Run2	Reunion	Etang Salé	April-08	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	27
Run3	Reunion	Ligne Paradis	October-07	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	31
Run4	Reunion	Savannah	April-08	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	28
Run5	Reunion	St André	April-08	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	26
Run6	Reunion	Entre-Deux	March-09	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	18
Run7	Reunion	Beauvallon Bras Panon	January-10	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	31
Run8	Reunion	Salazie	March-10	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	24

Supplementary Table 1 (continued)

Supplementary Table 2. Population genetic parameters for each sample. Hexp: Expected heterozygosity, Hn.b: Unbiased expected heterozygosity, Hobs: Observed heterozygosity, FIS: fixation index, IC95%: 95% confidence interval on FIS.

Sample	Hexp.	SE	Hn.b.	SE	Hobs.	SE	alleles/locus	Fis	IC95%		
Aus1	0.35	0.24	0.36	0.25	0.70	0.48	1.8	-0.99	-1.00	-	-0.98
Aus2	0.35	0.24	0.36	0.25	0.70	0.48	1.8	-0.99	-1.00	-	-0.97
Aus3	0.35	0.25	0.37	0.25	0.70	0.48	1.8	-0.97	-1.00	-	-0.94
Ben1	0.22	0.39	0.23	0.27	0.44	0.55	1.4	-1.00	-1.00	-	-1.00
Ben2	0.24	0.38	0.24	0.26	0.46	0.54	1.6	-0.95	-0.98	-	-0.91
Ben3	0.22	0.39	0.23	0.27	0.44	0.55	1.4	-1.00	-1.00	-	-1.00
Ben4	0.22	0.39	0.23	0.27	0.44	0.55	1.4	-1.00	-1.00	-	-1.00
Bra1	0.31	0.27	0.31	0.27	0.60	0.52	1.7	-0.94	-0.97	-	-0.92
Cam1	0.22	0.39	0.23	0.27	0.44	0.55	1.6	-0.98	-1.00	-	-0.96
Cam2	0.23	0.40	0.24	0.28	0.44	0.55	1.6	-0.90	-0.94	-	-0.88
Cam3	0.22	0.39	0.23	0.27	0.44	0.55	1.4	-1.00	-1.00	-	-1.00
Cam4	0.22	0.39	0.23	0.27	0.44	0.55	1.4	-1.00	-1.00	-	-1.00
Cam5	0.28	0.38	0.28	0.27	0.56	0.56	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Col1	0.31	0.27	0.32	0.27	0.60	0.52	1.7	-0.93	-0.97	-	-0.92
Col2	0.31	0.27	0.32	0.28	0.60	0.52	1.8	-0.91	-0.93	-	-0.89
Col3	0.30	0.26	0.31	0.27	0.60	0.52	1.7	-0.97	-1.00	-	-0.94
Ecu1	0.30	0.26	0.31	0.27	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Gua1	0.30	0.26	0.31	0.27	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Gua2	0.30	0.26	0.32	0.27	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Gua3	0.30	0.26	0.31	0.27	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Gua4	0.30	0.26	0.31	0.27	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Gua5	0.30	0.26	0.31	0.27	0.60	0.52	1.7	-0.97	-1.00	-	-0.94
Haw1	0.30	0.26	0.31	0.27	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Haw2	0.30	0.26	0.31	0.26	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Haw3	0.30	0.26	0.30	0.26	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Ken1	0.37	0.25	0.38	0.25	0.58	0.49	2.6	-0.57	-1.00	-	-0.22
Ken2	0.30	0.26	0.31	0.27	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Ken3	0.30	0.26	0.31	0.26	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Ken4	0.30	0.26	0.31	0.26	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Ken5	0.22	0.39	0.24	0.28	0.44	0.55	1.4	-1.00	-1.00	-	-1.00
Lou1	0.30	0.26	0.31	0.26	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Lou2	0.30	0.26	0.31	0.26	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Lou3	0.30	0.26	0.31	0.27	0.60	0.52	1.7	-0.98	-1.00	-	-0.95
Lou4	0.30	0.26	0.31	0.26	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Lou5	0.30	0.26	0.30	0.26	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Lou6	0.30	0.26	0.31	0.26	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Lou7	0.30	0.26	0.30	0.26	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Lou8	0.30	0.26	0.30	0.26	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Mar1	0.30	0.26	0.33	0.28	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Mar2	0.30	0.26	0.31	0.26	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Mar3	0.30	0.26	0.31	0.27	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Mau1	0.30	0.26	0.31	0.26	0.60	0.52	1.6	-1.00	-1.00	-	-1.00
Nig1	0.22	0.39	0.23	0.27	0.44	0.55	1.4	-1.00	-1.00	-	-1.00
Nig2	0.22	0.39	0.23	0.27	0.44	0.55	1.4	-1.00	-1.00	-	-1.00
Run1	0.35	0.24	0.36	0.25	0.70	0.48	1.7	-1.00	-1.00	-	-1.00
Run2	0.36	0.25	0.36	0.25	0.70	0.48	1.8	-0.96	-0.99	-	-0.94
Run3	0.35	0.24	0.36	0.25	0.70	0.48	1.7	-1.00	-1.00	-	-1.00
Run4	0.35	0.24	0.36	0.25	0.70	0.48	1.8	-0.99	-1.00	-	-0.97
Run5	0.35	0.24	0.36	0.25	0.70	0.48	1.7	-1.00	-1.00	-	-1.00
Run6	0.35	0.24	0.36	0.25	0.70	0.48	1.7	-1.00	-1.00	-	-1.00
Run7	0.35	0.24	0.36	0.25	0.70	0.48	1.7	-1.00	-1.00	-	-1.00
Run8	0.35	0.24	0.36	0.25	0.70	0.48	1.7	-1.00	-1.00	-	-1.00

Supplementary Table 3. Pairwise F_{ST} values among samples pooled in four geographic zones.

	Australia	Western Africa	USA
Australia			
Western Africa	0.619		
USA	0.389	0.671	
South America - Indian Ocean - Caribbean	0.257	0.640	0.341

Table 1. Characteristics of aphid samples.

Sample	Location	Date	Host plant (com.)	Host plant (sci.)	sample size
Run1	CERF St Marie	June-07	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	15
Run2	Cerf Etang Salé	April-08	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	27
Run3	Ligne Paradis	October-07	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	31
Run4	ISB Savannah	April-08	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	28
Run5	St André - sucrerie Bourbon	April-08	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	26
Run6	Entre Deux	March-09	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	18
Run7	Beauvallon Bras Panon	January-10	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	31
Run8	Salazie	March-10	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	24
Run9	CERF St Marie	October-07	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	32
Run10	CERF St Marie	October-07	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	28
Run11	Maduran St Leu	April-08	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	32
Run12	Petite île	April-08	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	30
Run13	CERF St Philippe	April-08	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	32
Run14	Piton St Rose	April-08	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	31
Run15	Entre Deux	June-08	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	3
Run16	Vue Belle	January-10	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	22
Run17	Salazie	March-10	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	32
Run18	grande chaloupe	January-10	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	32
Run19	Bassin Martin	February-10	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	32
Run20	Savanna ISB	January-10	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	29
Run21	Parc Colosse St André	January-10	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	25
Run22	Piton St Rose	February-10	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	31
Run23	St Gilles les Ht	February-10	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	29
Run24	St Anne	February-10	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	25
Run25	Bassin martin	February-10	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	32
Run26	Petite île	March-10	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	30
Run27	Cerf Etang Salé	March-10	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	32
Run28	Cilaos (mare sèche)	April-10	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	24
Run29	Saint Philippe (ravine pelote)	April-10	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	31
Run30	Cilaos (cap rouge)	April-10	wild sudan grass	<i>Sorghum verticilliflorum</i> (Steud.) Stapf	27
Run31	St Anne	April-09	sugarcane	<i>Saccharum</i> sp.	27

III Diversité génétique et races d'hôte de *Melanaphis sacchari* à la Réunion

Molecular diversity and host plant association of the aphid *Melanaphis sacchari* in Reunion.

B. Fartek ^{1,2*}, S. Mississippi ¹, S. Nibouche ¹, L. Costet ¹, H. Delatte ¹ & B. Reynaud ¹

¹ Cirad, UMR PVBMT, F-97410 Saint Pierre, La Réunion, France

² Université de la Réunion, UMR PVBMT, F-97410 Saint Pierre, La Réunion, France

RESUME :

Objectifs – Les objectifs de cette étude étaient (i) de décrire la diversité génétique des populations de *Melanaphis sacchari* à la Réunion et (ii) de rechercher l'existence d'une structuration par la plante hôte, canne à sucre (*Saccharum* sp.) ou sorgho sauvage (*Sorghum verticilliflorum*).

Matériel et Méthodes – Nous avons réalisé 31 prélèvements de pucerons, 15 sur canne à sucre et 16 sur sorgho (**Tab. 1**). Huit de ces prélèvements étaient communs avec l'étude de diversité mondiale présentée au chapitre précédent. Les pucerons ont été génotypés avec dix amorces microsatellites. Le séquençage de la COI a été réalisé sur 19 individus. Les méthodes étaient identiques à celles présentées au chapitre précédent.

Résultats – Les données microsatellites (**Tab. 2**), obtenues sur 848 pucerons, ont permis de mettre en évidence un polymorphisme sur 5 des 10 loci, caractérisant 13 génotypes (MLG). Parmi ces 13 MLG, seul le génotype 'invasif' Ms11 a été observé hors de la Réunion au cours de l'étude de diversité mondiale. Le séquençage COI réalisé sur 19 pucerons, appartenant à 12 des 13 MLG microsatellite, a mis en évidence un haplotype unique. Trois des MLG microsatellite, Ms11, Ms15 et Ms16, ont représenté respectivement 17%, 30% et 39% du nombre total d'individus. L'analyse de la diversité génétique avec le logiciel DARWIN par un NJ tree basé sur une matrice de dissimilarité par simple matching (**Fig. 1**) n'a pas fait apparaître de groupes au sein des 13 MLG. De même, l'analyse des données par le logiciel Structure (Sup. Fig. 1) n'a mis en évidence aucun cluster. En revanche, l'examen de la répartition des MLG par plante hôte a révélé une distribution hétérogène de certains des MLG majoritaires, Ms11 étant plus fréquent sur la canne à sucre que sur le sorgho, alors qu'à

Table 2. Observed microsatellite Multi Locus Genotypes (MLG): allele size (bp) at each locus and distribution by host plant.

MLG	CIR-MS-		CIR-MS-B03	CIR-MS-C08 ^a	CIR-MS-			CIR-MS-G12	CIR-MS-G02 ^a	CIR-MS-E03 ^a	CIR-MS-D02 ^a	Number of individuals	
	CIR-MS-G08	G403			CIR-MS-G01	E01	<i>Saccharum</i> sp.					<i>Sorghum</i> sp.	
Ms11	233 / 233	251 / 259	213 / 213	197 / 199	185 / 210	247 / 247	212 / 216	199 / 199	186 / 193	228 / 232	120	20	
Ms12	233 / 233	251 / 259	213 / 213	195 / 197	185 / 210	247 / 247	212 / 216	199 / 205	186 / 193	228 / 232	24	5	
Ms13	233 / 233	251 / 259	213 / 213	197 / 199	185 / 210	247 / 247	212 / 216	199 / 201	186 / 201	228 / 232	18		
Ms14	233 / 233	251 / 259	213 / 213	195 / 197	185 / 210	247 / 249	212 / 216	199 / 203	186 / 193	228 / 232	5	1	
Ms15	233 / 233	251 / 259	213 / 213	197 / 199	185 / 210	247 / 247	212 / 216	199 / 201	186 / 193	228 / 232	2	253	
Ms16	233 / 233	251 / 259	213 / 213	195 / 197	185 / 210	247 / 247	212 / 216	199 / 203	186 / 193	228 / 232	233	99	
Ms17	233 / 233	251 / 259	213 / 213	197 / 199	185 / 210	247 / 247	212 / 216	199 / 201	186 / 193	224 / 228	2		
Ms18	233 / 233	251 / 259	213 / 213	197 / 201	185 / 210	247 / 247	212 / 216	199 / 201	186 / 193	228 / 232	1		
Ms19	233 / 233	251 / 259	213 / 213	195 / 197	185 / 210	247 / 247	212 / 216	199 / 203	186 / 193	220 / 228	1		
Ms20	233 / 233	251 / 259	213 / 213	195 / 197	185 / 210	247 / 247	212 / 216	199 / 203	186 / 193	228 / 230	23		
Ms21	233 / 233	251 / 259	213 / 213	195 / 197	185 / 210	247 / 247	212 / 216	199 / 203	186 / 193	228 / 234	29		
Ms22	233 / 233	251 / 259	213 / 213	197 / 199	185 / 210	247 / 247	212 / 216	199 / 199	186 / 193	220 / 232	6	1	
Ms23	233 / 233	251 / 259	213 / 213	197 / 199	185 / 210	247 / 247	212 / 216	199 / 199	188 / 193	228 / 232	5		

^a polymorphic loci

l'inverse Ms15 n'a été quasi exclusivement observé que sur le sorgho (**Tab. 2 et Fig. 2**). L'AMOVA réalisée avec le logiciel ARLEQUIN (**Tab 3**) a confirmé l'existence d'une structuration génétique significative ($P = 0.001$) liée à la plante hôte.

Perspectives – La confirmation de l'association à la plante-hôte de certains MLG est en cours avec des expérimentations de transferts entre sorgho et canne à sucre menées en laboratoire sur les trois MLG majoritaires.

Table 3. Results from AMOVA with Arlequin software for 10 loci microsatellite data analysis of aphids grouped by host plant.

Source of Variation		d.f.	Sum of Squares	Variance components	Percentage of Variation	Fixation indices	Significance tests
host plant	Among groups	1	47.9	0.05	Va	FCT	P = 0.001
	Among populations within groups	29	146.1	0.06	Vb	FSC	P < 10 ⁻⁴
	Within populations	1665	2988.6	1.79	Vc	FST	P < 10 ⁻⁴

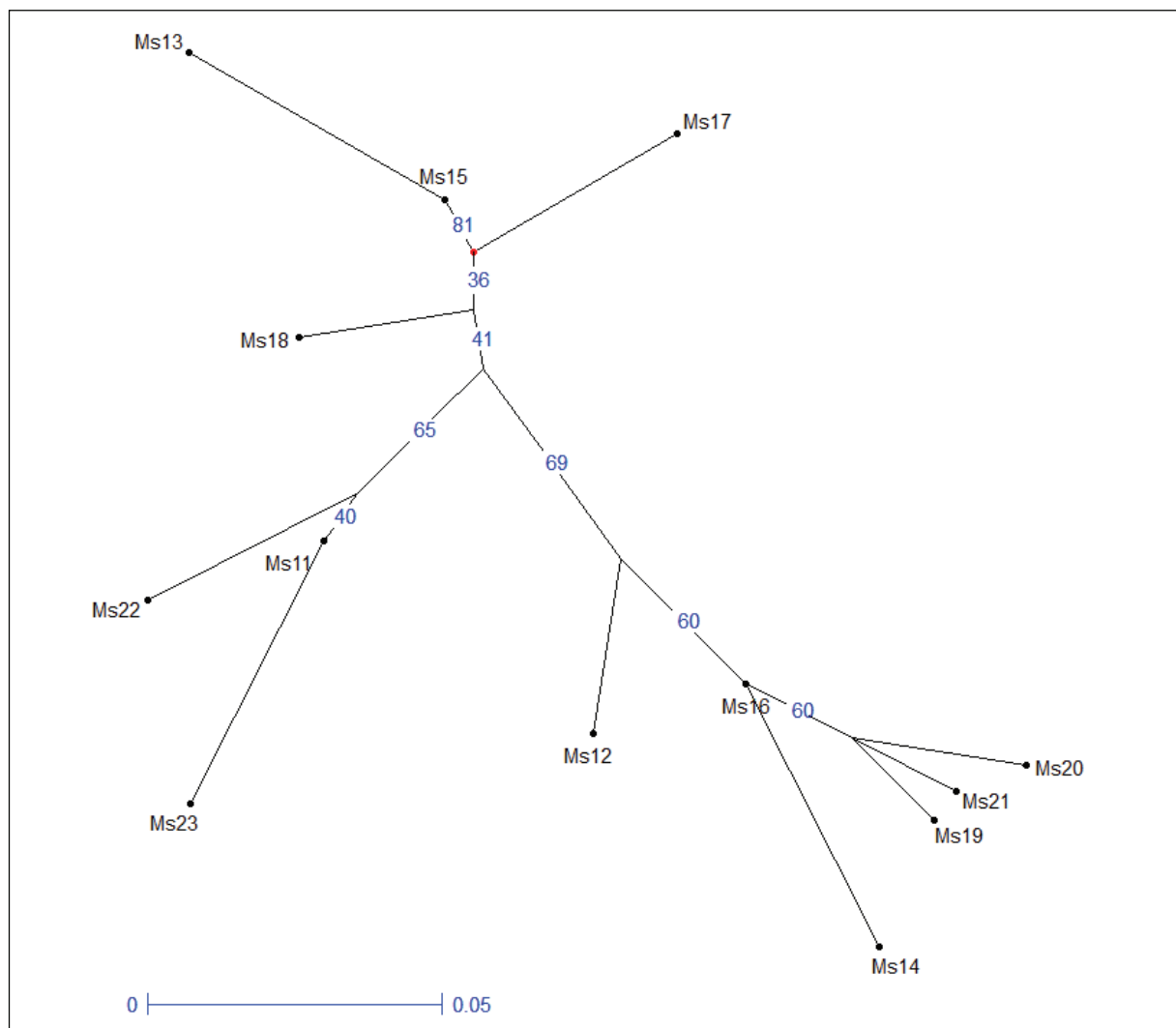
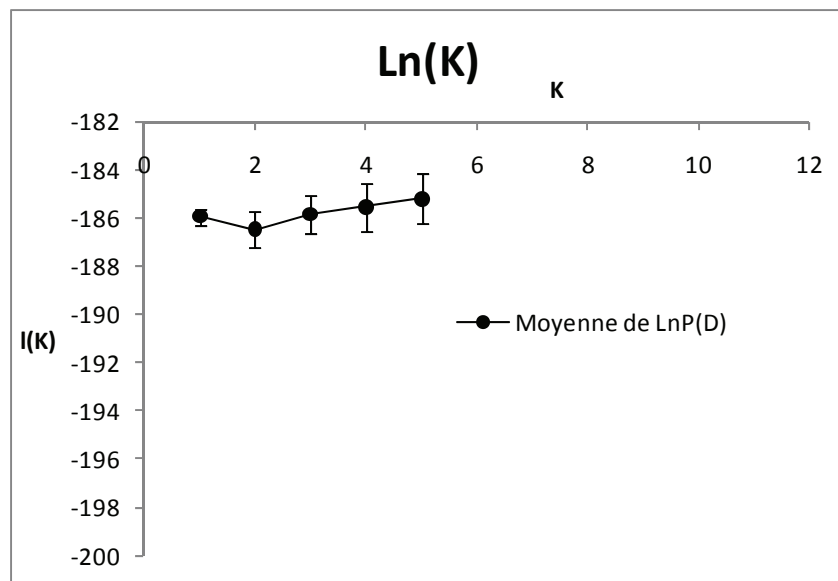


Figure 1. NJ tree from simple matching dissimilarity matrix computed by Darwin software with 10 microsatellite loci data. Bootstrap values (10,000 replications) are represented in blue.





Supplementary Figure 1. Plotting of likelihood of k value from the analysis of 10 loci microsatellite data with the Structure software

DISCUSSION

« Where we have sexual reproduction, a species can be objectively defined as a group of organisms which reproduce sexually amongst themselves but don't reproduce with members of other species. Where we don't have sexual reproduction - as in asexual species, or in fossils where we have no idea of how they reproduced - then there is no objective definition of the species, and the species just becomes like the genus, the family or the class. It's subject to arbitrary human decision.»

- Richard Dawkins

Discussion

I Génétique d'association pour la résistance à la maladie de la feuille jaune

Ces travaux reposent sur une étude de génétique d'association entre des traits phénotypiques mesurés au champ, ici l'incidence du virus et du vecteur, et des marqueurs moléculaires répartis sur le génome de la canne à sucre. Cette association marqueurs/traits exploite le fort déséquilibre de liaison existant chez la canne à sucre, qui résulte du faible nombre d'épisodes de croisements au cours des schémas de sélection dont sont issus les cultivars modernes. Chez la canne à sucre, l'étendue du DL permet de réaliser des études de génétique d'association et d'obtenir de bons niveaux de détection, malgré une faible densité de marquage.

Cette étude a été conduite en parallèle dans deux sites, Guadeloupe et Réunion, qui constituent deux contextes épidémiologiques différents, en utilisant deux panels de cultivars, comportant 29 accessions communes.

1. Résultats

- Les niveaux d'incidence du virus (Guadeloupe et Réunion) et par de vecteur (Réunion) varient significativement en fonction du cultivar, ce qui met en évidence une variabilité génotypique de la résistance à la maladie dans le matériel étudié. Par ailleurs, aucune interaction site x incidence du virus n'a été détectée pour les 29 cultivars communs aux deux panels.
- Une corrélation phénotypique positive et significative, principalement due à la corrélation génotypique, a été observée entre l'incidence du SCYLV et celle du vecteur.
- Notre étude a permis d'identifier 76 marqueurs, correspondant à 45 haplotypes, significativement associés à la résistance ou à la sensibilité à la maladie de la feuille jaune, ou à son vecteur. Cinq de ces haplotypes associés à l'incidence du SCYLV ont

pu être validés entre les deux panels, avec un effet qualitatif concordant entre les deux sites.

- Trois haplotypes regroupent des marqueurs associés à la fois à l'infestation par le vecteur et à l'incidence du virus dans l'un des deux panels. Deux de ces haplotypes ont été confirmés entre les deux panels pour leur association avec l'incidence du virus.

2. Perspectives

Le phénotypage réalisé a permis d'évaluer en conditions d'infestation naturelle un grand nombre de cultivars (344) représentatifs du matériel génétique utilisé en sélection. Cet effort de phénotypage dans deux conditions d'infestation différentes, échelonné sur plusieurs années de culture, impliquant un grand nombre de cultivars, est probablement le plus complet effectué à ce jour.

Plusieurs perspectives peuvent être envisagées pour ces travaux de génétique d'association : (i) identifier et cartographier les loci de résistance (ii) utiliser les associations pour prédire la valeur phénotypique de cultivars à partir leur génotype au sein du matériel élite utilisé en sélection et (iii) expliquer la corrélation génotypique entre la résistance au vecteur et l'incidence de la maladie.

2.1 Cartographie d'un locus de résistance

La première perspective serait de vérifier si certains des haplotypes identifiés contiennent des gènes majeurs et le cas échéant, de les cartographier.

La première étape serait de confirmer l'association des haplotypes aux traits phénotypiques dans des descendances biparentales. Cette étude imposerait de réaliser des croisements ciblés résistant x sensible, de génotyper leurs descendants, et de les phénotyper pour la résistance à la maladie en conditions d'infestation naturelle, ou bien par inoculation en conditions contrôlées. Lors de cette étape, le choix des géniteurs est important : la descendance doit permettre de visualiser la ségrégation d'un seul haplotype de résistance, dont la fréquence des marqueurs devrait être comparable à celle des cultivars résistants dans la population. La présence d'un gène majeur pourrait être mise en évidence dans le cas d'une ségrégation 1:1 ou 3:1 dans la descendance, pour un gène présent respectivement en simple ou double dose chez le parent résistant. Cette étape de confirmation des haplotypes demande un travail conséquent, notamment en termes de phénotypage des descendants. La validation d'un haplotype nécessite en effet de réaliser plusieurs croisements, représentant plusieurs centaines de clones, et

plusieurs années de phénotypage. Cela implique donc d'optimiser le nombre de croisements, et de développer une méthode efficace d'inoculation du virus.

La deuxième étape de la caractérisation, après l'identification dans une descendance biparentale, concerne la cartographie fine autour du locus cible. L'approche consiste à identifier des marqueurs proches d'un locus, puis à augmenter la densité de marquage, afin de réaliser une cartographie fine du locus. Une des méthodes les plus rapides et courantes utilisées pour caractériser des marqueurs liés à un trait phénotypique est la méthode de la 'bulked segregant analysis' (BSA) (Michelmore *et al.* 1991). Elle consiste à 'bulker', c'est-à-dire regrouper des clones d'une descendance présentant de mêmes traits phénotypiques, et d'identifier des marqueurs polymorphes entre les groupes. Cette méthode a déjà été utilisée pour cartographier des résistances au puceron, notamment chez le blé (Liu *et al.* 2001 ; Liu *et al.* 2002) ; elle a également été employée chez la canne à sucre pour détecter des marqueurs liés au gène de résistance à la rouille *Bru1* (Asnaghi *et al.* 2004). Une fois que le locus de résistance a été cartographié, une approche de 'marche chromosomique' peut être envisagée afin d'établir un lien entre la carte génétique et la carte physique du locus. Par la suite, l'identification du gène en lui-même repose sur le criblage de banques de séquences BAC (Bacterial Artificial Chromosome), afin d'identifier un clone contenant entièrement la région cible (marqueurs flanquants et locus de résistance) (Le Cunff *et al.* 2008). Ce criblage peut être réalisé sur des banques spécifiques de canne à sucre, ou éventuellement d'espèces proches en exploitant la synténie entre la canne à sucre et les espèces proches de poacées, notamment le sorgho et le riz (Paterson 2006).

Cette approche permettrait également de développer des marqueurs très proches du locus de résistance. Ces marqueurs, une fois validés sur une collection représentative du germplasm, pourraient être utilisés comme marqueurs 'diagnostic', et ainsi servir pour l'identification du gène dans le matériel élite.

2.2 Validation et approches prédictives en sélection

Afin d'utiliser les marqueurs dans l'optique d'une sélection assistée par marqueurs, il est nécessaire de valider les marqueurs détectés dans le panel 'd'apprentissage' qui correspond à celui de notre étude. La validation doit être réalisée dans population de cultivars élites indépendante, dite 'population test'. Cette approche permet de s'assurer que les marqueurs peuvent révéler du polymorphisme dans d'autres populations que celle où ils ont été générés. Il s'agit également de vérifier que l'association marqueur-trait fonctionne sur le matériel élite, dont la diversité et la structure génétique sont différentes du panel d'apprentissage. Une fois

les marqueurs validés, l'utilisation de tels outils de prédiction permettrait d'améliorer l'efficacité du phénotypage : c'est le principe de la sélection assistée par marqueurs, qui a notamment pour but de permettre la prédiction du phénotype à partir d'un, ou quelques marqueurs moléculaires validés. Dans le cas du SCYLV, le phénotypage d'une collection ou d'une descendance est fastidieux, notamment parce que l'inoculation contrôlée est mal maîtrisée, et donc difficilement utilisable sur un grand nombre d'accessions ; la prédiction du phénotype assistée par marqueurs permettrait donc de s'affranchir de ces contraintes. Ce type d'approche, largement utilisé en sélection animale (Mrode et Thompson 2005), peut être utilisé avec succès chez les plantes pour l'amélioration variétale (Varshney *et al.* 2005).

Deux types d'approches prédictives peuvent être utilisés à cet effet. La première approche consiste à réaliser une régression linéaire simple, c'est-à-dire basée sur des corrélations entre génotype et phénotype, à partir d'un petit nombre de marqueurs dits 'fonctionnels', c'est-à-dire associés à une fonction putative (Andersen et Lübberstedt 2003). Une deuxième approche vise à d'obtenir une prédiction plus fine en utilisant l'ensemble des marqueurs générés lors du génotypage. Ce type d'approche est appelée 'sélection (pan)génomique' (Meuwissen *et al.* 2001 ; Heffner *et al.* 2009) ; dans notre cas, le fort DL présent chez la canne, associé à l'utilisation de marqueurs DArTs à haut débit, pourrait assurer une densité de marquage suffisante qui permet d'envisager ce travail à plus long terme.

2.3 Lien entre résistance au vecteur et incidence de la maladie

Trois hypothèses peuvent permettre d'expliquer que les haplotypes les plus fortement associés à la résistance au virus soient également associés à la résistance au vecteur :

- les haplotypes sont localisés dans des clusters de résistance, c'est-à-dire des zones du génome riches en facteurs de résistance à plusieurs agents pathogènes ou insectes.
- La résistance au vecteur a un effet suffisamment fort pour affecter l'efficacité de la transmission, et donc l'incidence de la maladie.
- Les pucerons sont plus attirés par les cultivars infectés par le virus, ce qui est connu pour le genre *Polyomavirus* (Ferreira et Moreno 2009).

La validation de ces hypothèses nécessite de parvenir à séparer les deux effets, s'ils sont distincts, ou démontrer qu'ils sont corrélés.

L'hypothèse de facteurs de résistance distincts mais associés dans un cluster ne pourra être résolue qu'en identifiant dans une descendance biparentale un événement de recombinaison séparant les deux traits phénotypiques. La faisabilité de cette approche est très limitée par la

capacité actuelle de phénotypage d'un grand nombre d'individus pour la résistance au virus et au puceron.

L'hypothèse d'un lien épidémiologique entre la résistance au vecteur et la réduction de l'incidence de la maladie pourrait être testée ou bien en laboratoire, ou bien en conditions d'infestation naturelle. La première méthode consisterait à réaliser des tests de transmission en conditions contrôlées ; pour cela, il serait nécessaire d'utiliser une forte dose d'inoculum afin de surmonter de la résistance au vecteur (Dintinger *et al.* 2005). La seconde méthode consisterait à valider le lien épidémiologique au champ, en utilisant des accessions sensibles au virus, et présentant des niveaux variables de résistance au vecteur. On mesurerait alors la vitesse de contamination par le virus de plants sains en conditions d'infestation naturelle, afin de tester si elle dépend ou non de la résistance au puceron.

La troisième hypothèse pourrait être testée par des expériences de préférence entre des plants d'une même variété, contaminés ou non par le virus. Ce type de test a par exemple permis de démontrer l'attractivité accrue de plants infectés par le PLRV (*Potato leafroll virus*), un autre Polérovirus, pour le puceron *Myzus persicae* (Alvarez *et al.* 2007).

2.4 Remarques pour conclure

Les sources de résistance mises en évidence au cours de cette étude ont toutes les chances d'être efficaces dans de nombreux contextes agronomiques : certains haplotypes ont pu être validés dans les deux panels malgré les différences de contexte épidémiologique, et malgré la diversité des cultivars portant ces haplotypes. Ce sont donc des haplotypes stables, présents dans plusieurs fonds génétiques, et efficaces dans plusieurs contextes. Leur validation permettrait donc de sélectionner des cultivars porteurs de résistances au virus et à son vecteur, ayant un impact notable sur la transmission du virus, et ce dans plusieurs contextes épidémiologiques : cela constituerait un gage d'efficacité et de durabilité pour ces résistances.

II Etude de la résistance à *Melanaphis sacchari* chez le cultivar R 365

1. Rappel des résultats

- Un cultivar fortement résistant aux pucerons, R 365, a été identifié au champ parmi les moins infestés dans un essai comprenant 184 cultivars, en conditions d'infestation naturelle.
- La caractérisation de cette résistance au laboratoire a montré un effet double sur la biologie des pucerons : d'une part une résistance par antixénose, réduisant la capacité de colonisation du puceron, et une résistance par antibiose, ayant un effet drastique sur les traits de vie du puceron, affectant sa capacité d'accroissement.
- L'étude du comportement alimentaire du puceron par EPG a montré que l'expression de la résistance agissait à deux niveaux : elle retarde l'apparition de la salivation dans le phloème (signaux E1) durant les quatre premières heures de l'interaction, puis empêche l'ingestion passive de sève élaborée (signaux E2) durant les huit premières heures, ce qui serait à l'origine de la réduction de fitness des pucerons sur ce cultivar.
- La résistance du cultivar R 365 affecte également une autre espèce de puceron présent sur canne à sucre, *Rhopalosiphum maidis*.

2. Perspectives

Les différents modes d'expression de la résistance caractérisés lors de cette étude sont comparables aux modes d'expression des résistances décrites dans la littérature : l'expression du gène *Vat* chez le melon contre *Aphis gossypii*, de *Mi* chez la tomate contre *Macrosiphum euphorbiae*, ou encore les différents gènes de résistance à *Acyrtosiphon pisum* et *Acyrtosiphon kondoi* chez *Medicago truncatula*, conduisent à une baisse de fitness par antibiose, par antixénose, et à une réduction de la capacité à ingérer de la sève élaborée dans le phloème. La plupart de ces résistances modèles sont dues à l'expression d'un unique gène de résistance caractérisé, et déployés dans des cultivars commerciaux (Dogimont *et al.* 2010) ; les démarches utilisées pour la caractérisation de ces sources de résistance pourraient donc servir de modèle à une étude approfondie de la résistance chez R 365.

Deux types de perspectives sont envisageables pour faire suite à notre travail : d'une part, caractériser les bases génétiques de la résistance chez R 365, et d'autre part, poursuivre le travail de caractérisation de la résistance, notamment dans son expression tissulaire, en se basant sur les modèles amplement étudiés dans la littérature. Dans cette optique, l'étude de la caractérisation fine de l'interaction permettrait d'envisager une approche gène-candidat afin d'ouvrir des pistes dans la caractérisation du contrôle génétique de la résistance à l'insecte chez la canne à sucre.

2.1 Bases génétiques de la résistance R 365

L'analyse des bases génétiques de la résistance R 365 devrait comporter deux étapes distinctes.

En premier lieu, l'analyse de la ségrégation de la résistance dans une descendance permettra de déterminer si la résistance identifiée est portée par un gène majeur unique ou par une résistance polygénique. La caractérisation du contrôle génétique de la résistance chez R 365 implique d'une part de réaliser des croisements avec un parent sensible, et d'autre part d'établir une méthode de diagnostic rapide et fiable des descendants. Les tests d'antibiose ont montré que la survie larvaire à trois jours est un bon indicateur de la résistance pour R 365 : il est serait donc possible de s'inspirer de Pitrat et Lecoq (1982) qui évaluent le nombre de larves produites en 3 jours par 4 adultes aptères pour identifier dans des descendances les individus porteurs du gène *Vat*. Le principal écueil à la production d'une descendance biparentale impliquant R 365 est l'obtention de graines : non seulement il peut être difficile de produire des graines pour certaines variétés, mais il faut de plus pouvoir accorder les périodes de floraison avec le parent sensible (Heinz et Tew 1987). Nous avons à ce jour réalisé plusieurs croisements impliquant R 365 et des cultivars sensibles, mais aucun n'a permis d'obtenir un nombre de descendants satisfaisant. La caractérisation en laboratoire d'autres cultivars résistants à *Melanaphis sacchari* est en cours afin de trouver de nouveaux géniteurs qui pourraient remplacer R 365 dans les croisements.

Dans l'hypothèse où un contrôle monogénique de la résistance serait mis en évidence chez R 365 ou un cultivar présentant le même niveau de résistance, des travaux de cartographie fine pourraient être engagés en s'inspirant de la démarche réalisée pour la caractérisation de la résistance à la rouille portée par le gène *Bru1*. Cette démarche est similaire à celle qui pourrait être entreprise à partir de l'étude d'association, et a été exposée dans la partie précédente.

2.2 Caractérisation fine de la résistance

Une seconde perspective pour nos travaux est de caractériser des mécanismes de résistance responsables de la modification de la biologie et du comportement alimentaire du puceron chez le cultivar R 365. Les modes d'expression ainsi que les niveaux de résistance du cultivar R 365 sont comparables à ceux d'autres couples plante/insecte ; il est donc possible d'utiliser des outils similaires à ces travaux afin d'affiner notre étude de son expression. Au moins deux niveaux d'étude peuvent être envisagés : i) au niveau histo-cytologique, afin de visualiser la localisation précise de l'expression de la résistance, et les modifications physiologiques chez la plante affectant la biologie du puceron et son comportement alimentaire et ii) au niveau moléculaire, afin de mettre en évidence les variations dans l'expression des gènes et des cascades de signalisation impliquées dans la mise en place de la résistance.

◆ *Expression tissulaire de la résistance*

L'étude approfondie de l'expression de la résistance au niveau tissulaire doit permettre d'élucider les mécanismes responsables des deux effets sur le comportement alimentaire : (i) le retard d'apparition de salivation dans le phloème, et (ii) l'absence d'ingestion passive.

(i) Le retard d'apparition de la salivation peut être dû à une augmentation du temps nécessaire à trouver le phloème, comme cela a été décrit sur d'autres modèles. Ce retard à la localisation du phloème peut être lié à des difficultés rencontrées par les stylets au cours de leur progression dans le mésophylle, ce qui a été observé chez les plantes porteuses du gène *Vat* (Chen *et al.* 1997 ; Martin *et al.* 2003).

Lors des analyses des enregistrements d'EPG, nous avons remarqué la présence de signaux de type R-Pd (repetitive potential drops) chez les deux cultivars ; ce signal, constitué d'une série de chutes de potentiels longues et rapprochées, correspond vraisemblablement à la pénétration répétée du même tube criblé précédant la phase E1 (Tjallingii et Gabrys 1999), et marquerait donc l'accès au phloème par le puceron. Une analyse plus poussée des chutes de potentiels (Pd) lors des phases de sondage précédent l'apparition de la salivation dans le phloème (E1) pourrait être un indice du temps réel nécessaire pour accéder au phloème, et permettrait de confirmer ce retard de localisation. Deux mécanismes ont été associés à la résistance au puceron dans le mésophylle : a) la production de formes actives de l'oxygène (ROS) liée à une réaction d'hypersensibilité (Klingler *et al.* 2009 ; Sarria *et al.* 2009), que l'on peut visualiser dans les feuilles avec une solution de diaminobenzédine (DAB) ; et b) les

dépôts de callose et de lignine épaississant la paroi cellulaire (Sarria *et al.* 2009), qui peuvent être visualisés en microscopie classique au moyen de colorations appropriées.

(ii) La réduction de l'ingestion passive de sève élaborée dans le phloème est généralement considérée comme le principal mécanisme de résistance des plantes aux pucerons (Klingler *et al.* 1998 ; Kaloshian *et al.* 2000). Cet effet sur le comportement alimentaire est lié à l'occlusion des tubes criblés et la baisse de pression résultante, qui limite la quantité de sève parvenant dans le cibarium (Will *et al.* 2008). Deux mécanismes de résistance induits dans le phloème sont connus pour obstruer les tubes criblés et stopper le flux de sève élaborée : un dépôt de callose sur les pores, qui a été démontré dans le cas de la résistance au delphacide du riz, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hao *et al.* 2008), et l'obstruction des pores du tube criblé par des composants du phloème – forisome et protéines phloémiennes (Will et van Bel 2006). La réduction ou l'absence d'ingestion passive serait donc liée à l'incapacité de l'insecte à prévenir le scellage du tube criblé induit par la plante (Will et van Bel 2006 ; Will *et al.* 2007). La réduction de l'alimentation peut être mise en évidence en quantifiant la quantité de sève élaborée ingérée par le puceron à l'aide de marqueurs radioactifs (Hao *et al.* 2008). Le dépôt de callose et l'accumulation de composés du phloème devant les pores du tube criblé peuvent être visualisés par microscopie à l'aide de marqueurs appropriés : bleu d'aniline pour la callose (Hao *et al.* 2008), marqueurs fluorescents pour le flux de sève élaborée (Knoblauch et van Bel 1998). Un autre mécanisme réduisant l'ingestion passive de sève élaborée pourrait être la présence de facteurs répulsifs ou toxiques dans la sève élaborée, qui affecteraient le comportement du puceron. Cette hypothèse est supportée par l'activation de la production de métabolites secondaires après infestation de plantes par pucerons dans de nombreux modèles (Thompson et Goggin 2006). Toutefois, le rôle de tels composés dans la résistance ne semble pas certain, et n'a pu être formellement démontré dans ces études. Par exemple, l'effet de pyrazoles, évalué dans le cadre de la caractérisation du gène *Vat*, semble indiquer que ces composés ne jouent pas de rôle dans la résistance au puceron (Chen *et al.* 1999) ; il semblerait que l'effet de tels composés sur la biologie du puceron se manifesterait uniquement dans le cadre de la spécificité de plante hôte.

♦ *Caractérisation moléculaire*

L'étude des cascades de signalisation et de l'expression des différents gènes induits peut constituer une autre piste intéressante pour caractériser la nature des interactions et de la résistance mise en œuvre. Les travaux réalisés notamment chez *Arabidopsis thaliana* (Moran

et Thompson 2001), la tomate (de Ilarduya *et al.* 2003 ; Li *et al.* 2006), ou *Medicago truncatula* (Klingler *et al.* 2009) ont permis de corréler la mise en place de la résistance avec la cinétique d'accumulation de molécules et l'activation de gènes connus pour être impliqués dans la mise en place de réponses de défense, notamment au cours de la HR : (i) accumulation de formes actives de l'oxygène (ROS) (Klingler *et al.* 2009), ou de molécules impliquées dans les voies de signalisation, notamment le SA (Acide Salicylique) par HPLC (Li *et al.* 2006), (ii) accumulation des transcrits de gènes impliqués dans les voies de signalisation par RT-PCR classique (de Ilarduya *et al.* 2003) ou par RT-PCR quantitative (Du *et al.* 2009), ou encore en utilisant des méthodes de gene silencing par virus (VIGs) pour supprimer spécifiquement l'expression de certains gènes (Li *et al.* 2006).

Pour la résistance à *Melanaphis sacchari*, l'activation des voies de signalisation et l'expression de gènes impliqués dans ces cascades de signalisation pourraient être comparées dans deux contextes : ou bien entre plantes infectées et non-infectées chez R 365, comme cela a été réalisé chez *Arabidopsis thaliana* (Moran et Thompson 2001), ou bien en comparaison avec un cultivar sensible ; dans le second cas, l'idéal aurait été de travailler sur des lignées quasi-isogéniques (Klingler *et al.* 2009), afin d'atténuer les différences dues aux différences de fonds génétique entre cultivars, ce qui est malheureusement impossible chez la canne à sucre.

D'autres approches ont été menées afin de caractériser de façon exhaustive l'ensemble des gènes dont l'expression est modifiée à la suite de l'interaction avec le puceron. Elles sont basées sur l'utilisation de puces d'expression, ou encore sur le séquençage d'ARN complets de la plante afin d'identifier les fragments cDNA correspondants à des gènes dont l'expression est modifiée après infestation par le puceron. Ces méthodes permettent d'avoir accès à un très large panel de gènes impliqués dans les réactions de défense, en particulier quand la caractérisation moléculaire de la résistance est incomplète. Les puces d'expression (microarray) ont notamment été utilisées chez l'orge (Delp *et al.* 2008), ou le sorgho (Zhu-Salzman *et al.* 2004 ; Park *et al.* 2006) ; des travaux d'hybridation soustractive impliquant une banque de cDNA ont été réalisés chez le pommier (Qubbaj *et al.* 2005) ou le blé (Boyko *et al.* 2006). Ces travaux ont permis d'identifier des cascades de signalisation ou des voies de synthèse de métabolites impliquées dans la résistance aux pucerons, sur des couples plante/insecte où les bases moléculaires de la résistance n'ont pas été amplement caractérisées. L'utilisation de méthodes basées sur des puces d'expression est envisageable sur notre modèle, en particulier grâce à aux banques de séquences d'EST existantes chez la canne à sucre.

III Taxonomie, diversité et structuration des populations de *Melanaphis sacchari*

1. Résultats obtenus

- L'étude de taxonomie a confirmé qu'il existe plusieurs groupes de populations génétiquement et morphologiquement distincts, dont deux correspondent aux espèces *M. sacchari* et *M. sorghi*. Les méthodes utilisées n'ont cependant pas permis de discriminer de façon certaine les deux espèces, puisque certains individus partagent les caractéristiques des deux taxa.
- Parmi les populations échantillonnées, aucune ne porte la trace d'événements récents de recombinaison sexuée : toutes les paires de loci sont en fort déséquilibre de liaison, et chaque population présente une très faible diversité locale. Cela indique que les lignées échantillonnées sont totalement asexuées dans les régions considérées pour cette étude.
- La diversité génétique des individus est fortement structurée par la localisation géographique, les populations étant vraisemblablement des lignées introduites avec un fort effet fondateur, et évoluant par mutation ; en revanche, aucun effet de la plante hôte sur la structure des populations n'a été mis en évidence à l'échelle mondiale.
- A la Réunion, un effet de l'hôte a été observé entre la canne à sucre et le sorgho sauvage, certains génotypes se trouvant préférentiellement sur l'une ou l'autre espèce.

2. Perspectives

2.1 Taxonomie : le complexe *Melanaphis* spp.

A l'évidence, les critères morphologiques proposés par Blackman et Eastop (1990), ainsi que l'utilisation du séquençage d'un fragment de la COI, sont insuffisants pour caractériser les deux espèces avec certitude dans nos échantillons. En effet, les deux critères divergent pour une partie des individus ; en particulier, les pucerons échantillonnés en Australie appartiennent à l'espèce *sacchari* d'après les critères morphologiques proposés par Blackman et al (1990), mais leur séquence COI est identique à celle des individus africains de l'espèce

sorghi. Par ailleurs, certains groupes décrits dans la bibliographie, notamment *Melanaphis indosacchari*, n'ont pas été caractérisés à l'aide d'outils moléculaires ; cette espèce est décrite comme une 'forme' de *M. sacchari*, parfois trouvée en mélange avec ce dernier sur certaines feuilles. Il paraît donc important d'appréhender la diversité taxonomique de nos échantillons, afin de faire concorder les données moléculaires avec des critères morphologiques pertinents. En termes de perspectives, cela imposerait de mesurer un plus grand nombre de critères morphométriques (Kim *et al.* 2010) et tester leur variabilité au sein de nos populations, afin d'évaluer le nombre de taxa potentiellement présents.

Le locus de la Cytochrome Oxydase est considéré comme permettant la meilleure distinction entre espèces de pucerons (Coeur d'Acier *et al.* 2007 ; Lozier *et al.* 2008) ; cependant, la variabilité à ce locus est parfois très faible, et ne suffit pas toujours à séparer efficacement des espèces proches (Footitt *et al.* 2008 ; Lee *et al.* 2011). Les travaux futurs devraient consister à poursuivre le séquençage de loci utilisés en phylogénie (Cyt B, 16S, EF1 α , ITS ou autres loci de référence)(Coeur d'Acier *et al.* 2008) sur un plus grand nombre d'individus, afin d'obtenir une divergence maximale entre les populations, et pouvoir confronter ces données moléculaires avec les données morphométriques.

2.2 Schémas et voies d'invasion

L'étude de la diversité génétique du puceron a permis de montrer que les populations de *Melanaphis sacchari* à l'échelle mondiale sont à la fois très peu diverses, et très structurées, avec une absence totale de reproduction sexuée. Ce constat suggère que les populations mondiales ont été introduites à partir d'un centre de diversité unique, inconnu à l'heure actuelle, et que cette introduction est globalement récente. Elle pourrait avoir eu lieu au cours des derniers siècles, en parallèle de celle de ses plantes hôtes, tout au long des mouvements de migration des populations humaines. Ces particularités font du complexe d'espèce *M.sacchari/sorghi/spp* un modèle remarquable d'espèce invasive, partageant des caractéristiques avec les 'superclones' décrits chez d'autres espèces de puceron (Vorburger *et al.* 2003 ; Zepeda-Paulo *et al.* 2010 ; Harrison *et al.* 2011). Ce succès démographique est une illustration du paradoxe des espèces invasives, qui parviennent à s'adapter efficacement à un nouvel environnement malgré les contraintes imposées par le bottleneck initial sur la diversité génétique des populations (Frankham 2005). Si le succès de ces superclones semble difficile à expliquer physiologiquement en termes d'adaptation (Castañeda *et al.* 2010), il semblerait qu'il tienne principalement à leur mode de reproduction, permettant un avantage

démographique notable sans apparition de la dépression de fitness causée par la consanguinité (Sakai *et al.* 2001 ; Frankham 2005).

Afin de poursuivre l'étude de la diversité à l'échelle mondiale, et formuler des hypothèses sur les routes de diffusion du puceron ayant abouti à la distribution actuelle, il serait nécessaire d'obtenir un échantillonnage plus exhaustif, notamment à l'échelle de l'Asie et de la région austronésienne. L'étude de la diversité génétique du puceron sur le continent asiatique permettrait d'améliorer notre compréhension de ce modèle invasif, et notamment d'identifier la zone d'origine des lignées mondiales, notamment du 'superclone' cosmopolite Ms11, afin d'identifier une cause possible de sa dispersion, et imaginer des mesures préventives pour limiter son introduction dans d'autres zones, ou ralentir sa diffusion. Une approche similaire a récemment été employée afin de caractériser l'historique et les voies de diffusion d'un 'superclone' de *Myzus persicae* en Amérique du Sud (Zepeda-Paulo *et al.* 2010). Chez cette espèce, la diffusion s'est vraisemblablement déroulée à partir d'introductions successives en Europe, puis sur le continent américain, depuis un centre de diversité inconnu.

Le centre de diversité de *Melanaphis sacchari* n'est pas connu, mais il pourrait correspondre à certaines régions asiatiques à hivers froids, notamment la Chine, où la présence de reproduction sexuée est supposée (Blackmann, pers comm.) ; ces régions abritent par ailleurs des clones hybrides interspécifiques naturels de canne à sucre depuis plusieurs milliers d'années. Ainsi, ces populations sexuées pourraient constituer un réservoir de diversité génétique, alimentant potentiellement des pools secondaires de diversité dans les régions plus chaudes du continent asiatiques. Ces réservoirs secondaires pourraient constituer une population source pour les génotypes invasifs observés au cours de notre étude : dans notre cas, il est possible que ces génotypes soient issus d'une zone de culture de la canne à sucre, potentiellement l'Inde, d'où la plupart des géniteurs de canne à sucre ont été dispersés depuis environ 150 ans.

2.3 Interactions entre diversité du puceron et variabilité des plantes hôtes

Les deux niveaux d'étude de la diversité du puceron proposent des conclusions complémentaires. La diversité à l'échelle mondiale est faible et extrêmement structurée : la plupart des régions échantillonnées ne semblent avoir subi qu'un événement unique d'introduction de l'insecte ; à ce niveau, aucun effet de la plante hôte n'a été mesuré. A la Réunion en revanche, nous avons observé des génotypes présentant des affinités variables

pour la plante hôte. Ces deux observations ne sont pas contradictoires : il est possible que le manque de diversité dans les autres régions soit uniquement dû au biais d'échantillonnage.

◆ *Diversité et interactions avec la résistance variétale*

Une perspective importante à nos travaux serait de confronter la diversité obtenue, notamment à la Réunion, face aux sources de résistance à *Melanaphis sacchari* chez la canne à sucre. La présence de biotypes contournants est en effet décrite sur plusieurs modèles, et pose un problème agronomique lorsqu'un gène a été déployé à grande échelle dans les variétés commerciales (Kim *et al.* 2008). Même en présence d'une faible variabilité génotypique, une forte pression de sélection, par exemple exercée par un gène majeur, peut aboutir à la sélection de génotypes contournants (Burd *et al.* 2006 ; Lombaert *et al.* 2009). Pour notre modèle, il semble donc primordial de confronter l'effet de la résistance portée par le cultivar R 365, décrite précédemment, avec la diversité génotypique de *Melanaphis sacchari* à la Réunion. Pour cela, nous envisageons de réaliser des tests de performance de type antibiose / antixénose, en utilisant le plus grand nombre possible de lignées isofemelles préalablement génotypées. Dans le cas où un génotype contournant serait détecté, cela pourrait par ailleurs constituer un outil intéressant dans la caractérisation de la résistance R 365 : il serait possible de comparer la composition de la salive aqueuse, qui peut varier entre génotypes de pucerons (Miles 1999), et ainsi potentiellement identifier un composé salivaire qui jouerait le rôle d'effecteur (Hogenhout *et al.* 2009) dans l'interaction avec R 365, comme cela est supposé dans d'autres modèles (De Vos et Jander 2009).

Cependant, cette confrontation de la diversité clonale avec la résistance variétale comporte nécessairement des limitations : d'une part, il est impossible de collecter suffisamment de pucerons pour couvrir de façon exhaustive la diversité présente localement, puisque nous ne connaissons pas la fréquence d'apparition de nouveaux génotypes, les lignées évoluant constamment sous l'effet de la mutation. De plus, cela soulève le problème de la diversité intra-clonale dans les populations. En effet, si le concept de MLG, génotype défini à partir d'un petit nombre de loci microsatellites, est commode pour étudier la phylogéographie des populations à une vaste échelle, elle masque cependant le fait qu'un clone est un ensemble de génomes indiscernables mais distincts (Lushai *et al.* 1998 ; Lushai *et al.* 2003). Cette variabilité intra-clonale peut notamment se révéler face à des sources de résistance : même en l'absence de variabilité génotypique visible, certaines lignées clonales présentent des profils différents de virulence face à un gène de résistance (Shufron et Payton 2009).

◆ *Diversité du vecteur et effet sur la transmission de maladies virales*

Outre l'interaction avec la résistance variétale aux pucerons, il est possible que la diversité du vecteur soit corrélée avec une variabilité dans la transmission du virus, ce qui présenterait un intérêt pour la compréhension de l'épidémiologie de la maladie de la feuille jaune.

Plusieurs facteurs permettent d'expliquer la différence de transmission entre populations de vecteurs : ou bien par une variabilité des compétences vectorielles, au niveau inter- ou intra-espèce (Power et Gray 1995), ou bien par une variabilité du comportement des pucerons entre génotypes (Power et Flecker 2008). La variabilité intra-spécifique des compétences vectorielles a été mise en évidence dans plusieurs modèles de virus transmis sur le mode circulant (Brault *et al.* 2010) ; par exemple, certains clones de *Sitobion avenae* sont connus pour être des vecteurs efficaces (HEV) ou faiblement efficaces (PEV) du BYDV-PRV (Papura *et al.* 2002). Cette variabilité pourrait s'expliquer par la présence ou l'absence de certaines protéines qui interagissent avec les particules virales dans le cibarium ou les glandes salivaires accessoires du puceron (Li *et al.* 2001 ; Burrows *et al.* 2006), et en favoriseraient l'acquisition (Yang *et al.* 2008). Elle est une hypothèse pour expliquer la forte spécificité vecteur/virus dans la transmission des virus circulants (Brault *et al.* 2010).

Chez *Melanaphis sacchari*, les deux niveaux de diversité abordés dans notre étude revêtent donc une importance pour la transmission du SCYLV : une variabilité des compétences vectorielles pourrait exister entre taxa, notamment entre *Melanaphis sacchari* et *M. sorghi*, mais aussi entre isolats, par exemple entre les génotypes décrits à la Réunion. Cette variabilité pourrait être testée en conditions contrôlées, en utilisant plusieurs lignées de pucerons préalablement génotypées, via des tests de transmission sur des variétés sensibles ou modérément résistantes au virus.

◆ *Races d'hôte : une spéciation écologique est-elle en marche ?*

La spécificité d'hôte, mesurée à la Réunion, doit être confirmée par des tests de performance en laboratoire. Ces tests devraient permettre de vérifier s'il y a bien un lien entre le génotype du puceron et la différence de fitness sur l'une des deux plantes hôte. Il faudra pour cela mesurer les performances respectives sur canne à sucre et sorgho des trois MLGs majoritaires à la Réunion : Ms 11, le génotype invasif mondial, présent quasi-exclusivement sur canne à sucre, Ms 15, trouvé spécifiquement sur sorgho, et Ms 16, génotype Réunionnais qui ne semble pas montrer de préférence d'hôte. Les génotypes Ms11 et Ms15 pourraient donc

constituer des races d'hôtes de *Melanaphis sacchari*, comme cela a été décrit chez plusieurs espèces de pucerons (Carletto *et al.* 2009).

La présence de différentes races d'hôtes pourrait par ailleurs constituer un réservoir de génotypes contournants pour la résistance variétale. Chez le puceron *Schizaphis graminum*, il semblerait que le contournement successif de plusieurs gènes de résistance chez le blé s'explique par l'introduction d'individus issus de populations présentes sur des graminées adventices proches, et non par la sélection exercée sur les populations déjà présentes au champ (Burd et Porter 2006). Cela pourrait être le cas pour certains génotypes de *M. sacchari* à la Réunion, spécialisés sur sorgho sauvage (*Sorghum verticilliflorum*), qui pourraient présenter des différences de sensibilité aux résistances, notamment face à la résistance caractérisée chez R 365.

◆ Créer de la diversité sans sexe : le rôle des symbiotes bactériens

Si l'avantage démographique conféré par la reproduction clonale parvient à pallier le manque de diversité (Sakai *et al.* 2001), et expliquer leur succès écologique invasif (Frankham 2005), les organismes clonaux sont cependant souvent décrits comme étant inertes d'un point de vue évolutif (Lynch *et al.* 1993). Cette vision est en partie erronée, car les possibilités d'évolution les organismes clonaux sont multiples (Lushai *et al.* 2003). Parmi celles-ci, l'acquisition de symbiotes par transfert horizontal est une manière d'acquérir de nouvelles fonctions ou avantages sélectifs sans le concours de la reproduction sexuée (Oliver *et al.* 2010 ; Tsuchida *et al.* 2011). Longtemps suspectée (Vavre *et al.* 1999 ; Sandström *et al.* 2001 ; Moran et Dunbar 2006) et démontrée récemment sur plusieurs modèles, l'acquisition par transfert horizontal de symbiotes bactériens peut se produire à partir de l'environnement (plante hôte, sol, en fonction du mode d'alimentation de l'insecte) (Kikuchi *et al.* 2007) ou via les parasitoïdes (Chiel *et al.* 2009). La même souche bactérienne peut être acquise par espèces ou des taxa sans lien phylogénétique, comme cela est suggéré par la vaste distribution de certaines espèces de symbiotes (Zchori-Fein et Perlman 2004). Parmi les gains de fonctions associés à l'acquisition de symbiotes, deux pourraient présenter un intérêt pour notre modèle d'étude : un rôle dans la transmission du virus, et un effet pour l'adaptation à l'hôte.

L'acquisition et la transmission de virus circulants est dépendante d'une protéine chaperone analogue à GroEL, joue un rôle dans l'acquisition des particules virales (van den Heuvel *et al.* 1994 ; Cilia *et al.* 2011). Cette interaction pourrait jouer un rôle dans la variabilité de la

capacité vectorielle entre génotypes, comme cela a été montré chez certains biotypes de *Bemisia tabaci* pour la transmission du TYLCV (Gottlieb *et al.* 2011).

Le rôle des symbiotes facultatifs dans l'adaptation à la plante hôte a été démontré chez le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* (Leonardo et Muir 2003 ; Tsuchida *et al.* 2004). La présence de certaines espèces de symbiotes facultatifs est impliquée dans la variation des traits de vie des pucerons sur différentes plantes hôtes (Ferrari *et al.* 2007), et pourrait avoir un rôle dans l'apparition de races d'hôte en limitant les flux de gènes entre populations en sympatrie (Leonardo et Mondor 2006).

Ainsi, la possibilité d'acquérir par transfert horizontal de nouvelles souches de symbiotes pourrait constituer un mécanisme adaptatif important pour certains génotypes de *Melanaphis sacchari*, et expliquer des différences de performance entre plantes hôtes (Tsuchida *et al.* 2011), même face à une diversité génotypique faible voire nulle.

2.4 Remarques pour conclure : quel statut taxonomique donner aux groupes *Melanaphis sacchari/sorghii*/spp ?

Ce débat touche de près à la notion d'espèce, particulièrement ténue dans le cas des arthropodes en général, et plus particulièrement pour les pucerons, pour lesquels le processus de spéciation pourrait être différent de celui en vigueur chez les vertébrés (Blackman et Eastop 2007). Cette ambiguïté s'exprime lors de l'utilisation d'outils moléculaires en taxonomie formelle : certains individus formellement identifiés comme appartenant à deux taxa distincts peuvent cependant présenter un profil identique pour des marqueurs moléculaires utilisés en taxonomie, (Žurovcova *et al.* 2010 ; Lee *et al.* 2011). La notion généralement admise permettant de délimiter une espèce (BSC : biological species concept) est celle d'un groupe d'individus échangeant du matériel génétique par le biais de la reproduction sexuée (Turelli *et al.* 2001). Chez la plupart des organismes, ce critère est aisément observable, et la spéciation écologique, qu'elle soit sympatrique – c'est-à-dire découlant de différences de performances pour des niches écologiques proches – ou allopatrique, résulte d'un isolement reproducteur entre des groupes d'individus issus d'une population historiquement interféconde (Orr 1995). Cette délimitation du concept d'espèce fait écho à la première formulation de la théorie de l'évolution de Darwin (Darwin 1859), et sa vision dichotomique de la spéciation, qui apparaît comme la séparation de deux groupes distincts à partir d'un ancêtre commun.

L'échange de matériel génétique étant un prérequis à la définition d'espèce, des groupes d'individus ne pratiquant pas la reproduction sexuée échappent à cette notion. Ainsi, si les

lignées de *Melanaphis sacchari/sorghii*/spp ont perdu la faculté de faire de la reproduction sexuée, ou si l'espèce est entièrement asexuée, il se pourrait bien que la notion d'espèce n'ait pas de sens, et qu'il nous appartienne de définir cette 'entité' comme un complexe de biotypes, ou bien d'espèces, en fonction de leur biologie et gamme d'hôte. Ce problème recouvre donc uniquement un sens dans un contexte épidémiologique : la question n'est pas de savoir si l'on a vraiment affaire à un complexe d'espèces, de biotypes ou encore de races d'hôtes, mais si chacune de ces entités présente une sensibilité propre vis-à-vis des sources de résistantes décrites, ou encore une variabilité dans la capacité à transmettre la maladie. Les perspectives devraient donc consister à caractériser cette variabilité dans le contexte de la spécificité d'hôte, ainsi que face aux sources de résistance au SCYLV et à son vecteur.

Bibliographie

- Abu Ahmad, Y., L. Costet, J.-H. Daugrois, S. Nibouche, P. Letourmy, J.-C. Girard and P. Rott (2007). "Variation in Infection capacity and in virulence exists between genotypes of *Sugarcane yellow leaf virus*." Plant Disease **91**(3): 253-259.
- Abu Ahmad, Y., L. Rassaby, M. Royer, Z. Borg, K. S. Braithwaite, T. E. Mirkov, M. S. Irey, X. Perrier, G. R. Smith and P. Rott (2006a). "Yellow leaf of sugarcane is caused by at least three different genotypes of *Sugarcane yellow leaf virus*, one of which predominates on the Island of Reunion." Archives of Virology **151**(7): 1355-1371.
- Abu Ahmad, Y., M. Royer, J.-H. Daugrois, L. Costet, J.-M. Lett, J. I. Victoria, J.-C. Girard and R. P. (2006b). "Geographical distribution of four *Sugarcane yellow leaf virus* genotypes." Plant-Disease **90**(9): 1156-1160.
- Agrama, Widle, Reese, Campbell and Tuinstra (2002). "Genetic mapping of QTLs associated with greenbug resistance and tolerance in *Sorghum bicolor*." Theoretical and Applied Genetics **104**(8): 1373-1378.
- Aitken, K., P. Jackson and C. McIntyre (2005). "A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo (eo) logous linkage groups in a sugarcane cultivar." Theoretical and Applied Genetics **110**(5): 789-801.
- Akbar, W., A. T. Showler, T. E. Reagan and W. H. White (2010). "Categorizing sugarcane cultivar resistance to the sugarcane aphid and yellow sugarcane aphid (Hemiptera: Aphididae)." Journal of Economic Entomology **103**(4): 1431-1437.
- Aljanabi, S., Y. Parmessur, H. Kross, S. Dhayan, S. Saumtally, K. Ramdoyal, L. Autrey and A. Dookun-Saumtally (2007). "Identification of a major quantitative trait locus (QTL) for yellow spot (*Mycovellosiella koepkei*) disease resistance in sugarcane." Molecular Breeding **19**(1): 1-14.
- Aljanabi, S. M., R. J. Honeycutt, M. McClelland and B. W. S. Sobral (1993). "A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L.SES 208." Genetics **134**(4): 1249.
- Alvarez, A. E., E. Garzo, M. Verbeek, B. Vosman, M. Dicke and W. F. Tjallingii (2007). "Infection of potato plants with potato leafroll virus changes attraction and feeding behaviour of *Myzus persicae*." Entomologia Experimentalis et Applicata **125**(2): 135-144.

- Andersen, J. R. and T. Lübberstedt (2003). "Functional markers in plants." Trends in Plant Science **8**(11): 554-560.
- Anderson, G., D. Papa, J. Peng, M. Tahir and N. V. Lapitan (2003). "Genetic mapping of *Dn7*, a rye gene conferring resistance to the Russian wheat aphid in wheat." Theoretical and Applied Genetics **107**(7): 1297-1303.
- Andru, S., Y.-B. Pan, S. Thongthawee, D. Burner and C. Kimbeng (2011). "Genetic analysis of the sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivar 'LCP 85-384'. I. Linkage mapping using AFLP, SSR, and TRAP markers." Theoretical and Applied Genetics: 1-17.
- Argandoña, V. H., L. J. Corcuera, H. M. Niemeyer and B. C. Campbell (1983). "Toxicity and feeding deterrence of hydroxamic acids from Gramineae in synthetic diets against the greenbug, *Schizaphis graminum*." Entomologia Experimentalis et Applicata **34**(2): 134-138.
- Artschwager, E. and E. W. Brandes (1958). Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) : origin classification characteristics and descriptions of representative clones. Washington DC, United States department of agriculture., 307pp.
- Asnaghi, C., F. Paulet, C. Kaye, L. Grivet, M. Deu, J. Glaszmann and A. D'Hont (2000). "Application of synteny across Poaceae to determine the map location of a sugarcane rust resistance gene." Theoretical and Applied Genetics **101**(5): 962-969.
- Asnaghi, C., D. Roques, S. Ruffel, C. Kaye, J. Y. Hoarau, H. Telismart, J. C. Girard, L. M. Raboin, A. M. Risterucci, L. Grivet and A. D'Hont (2004). "Targeted mapping of a sugarcane rust resistance gene (*Bru1*) using bulked segregant analysis and AFLP markers." Theoretical and Applied Genetics **108**(4): 759-64.
- Astier, S., J. Albouy, H. Lecoq and Y. Maury (2001). Principes de virologie végétale. Génome, pouvoir pathogène, écologie des virus. Paris, INRA Editions, 445pp.
- Birky, C. W. (2004). "Bdelloid rotifers revisited." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(9): 2651.
- Birky, C. W. J. (2010). "Giardia Sex? Yes, but how and how much?" Trends in parasitology **26**(2): 70-74.
- Blackman, R. L. (1974). "Life-cycle variation of *Myzus persicae* (Sulz.) (Hom., Aphididae) in different parts of the world, in relation to genotype and environment." Bulletin of Entomological Research **63**(04): 595-607.
- Blackman, R. L. and V. F. Eastop (2000). Aphids of the world crops: an identification and information guide, 2nd edition. Chichester, UK, John Wiley & Sons Ltdpp.

- Blackman, R. L. and V. F. Eastop (2006). Aphids on the world's herbaceous plants and shrubs. Chichester, UK, John Wiley & Sons Ltdpp.
- Blackman, R. L. and V. F. Eastop (2007). Taxonomic issues. Aphids as crop pests. H. Van Emden and R. Harrington. Wallingford, UK, CAB International: 1-29.
- Blackman, R. L., V. F. Eastop and P. A. Brown (1990). The biology and taxonomy of the aphids transmitting barley yellow dwarf virus. World Perspectives on Barley Yellow Dwarf International Workshop. P. A. Burnett. Udine (Italy), CIMMYT: 197-214.
- Boissot, N., S. Thomas, N. Sauvion, C. Marchal, C. Pavis and C. Dogimont (2010). "Mapping and validation of QTLs for resistance to aphids and whiteflies in melon." Theoretical and Applied Genetics **121**(1): 9-20.
- Borg, Z., F. Moonan, K. Braithwaite, T. E. Mirkov and G. Smith (2001). "Characterising the genetic diversity of Sugarcane yellow leaf virus." Proceedings of International Sugarcane Technologists **24**: 654-656.
- Borth, W., J. S. Hu and S. Schenck (1994). "Double-stranded RNA associated with sugarcane yellowleaf syndrome." Sugar Cane(3): 5-8.
- Bos, J. I. B., D. Prince, M. Pitino, M. E. Maffei, J. Win and S. A. Hogenhout (2010). "A functional genomics approach identifies candidate effectors from the aphid species *Myzus persicae* (Green Peach Aphid)." PLoS Genetics **6**(11): e1001216.
- Bournoville, R., J.-C. Simon, I. Badenhauer, C. Girusse, T. Guilloux and S. André (2000). "Clones of pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) distinguished using genetic markers, differ in their damaging effect on a resistant alfalfa cultivar." Bulletin of Entomological Research **90**(01): 33-39.
- Bouvaine, S., N. Boonham and A. E. Douglas (2011). "Interactions between a luteovirus and the GroEL chaperonin protein of the symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola* of aphids." Journal of General Virology: vir. 0.029355-0v1.
- Boyko, E. V., C. M. Smith, V. K. Thara, J. M. Bruno, Y. Deng, S. R. Starkey and D. L. Klaahsen (2006). "Molecular basis of plant gene expression during aphid invasion: wheat Pto-and Pti-like sequences are involved in interactions between wheat and Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae)." Journal of Economic Entomology **99**(4): 1430-1445.
- Braham, W. S. and N. N. Winstead (1957). "Inheritance of resistance to root-knot nematodes in tomatoes." Proceedings of American Society for Horticulture Science **69**: 372-377.
- Brault, V., E. Herrbach and C. Rodriguez-Medina (2001). Luteoviruses, John Wiley & Sons, Ltdpp.

- Brault, V., M. Uzest, B. Monsion, E. Jacquot and S. Blanc (2010). "Aphids as transport devices for plant viruses." Comptes Rendus Biologies **333**(6-7): 524-538.
- Bremer, G. (1961). "Problems in breeding and cytology of sugar cane." Euphytica **10**(1): 59-78.
- Breseghello, F. and M. E. Sorrells (2006). "Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars." Genetics **172**(2): 1165-1177.
- Bromley, A., J. Dunn and M. Anderson (1979). "Ultrastructure of the antennal sensilla of aphids." Cell and Tissue Research **203**(3): 427-442.
- Bromley, A., J. Dunn and M. Anderson (1980). "Ultrastructure of the antennal sensilla of aphids." Cell and Tissue Research **205**(3): 493-511.
- Burd, J. D. and D. R. Porter (2006). "Biotypic diversity in Greenbug (Hemiptera: Aphididae): characterizing new virulence and host associations." Journal of Economic Entomology **99**(3): 959-965.
- Burd, J. D., D. R. Porter, G. J. Puterka, S. D. Haley and F. B. Peairs (2006). "Biotypic variation among North American Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) populations." Journal of Economic Entomology **99**(5): 1862-1866.
- Burner, D. and B. Legendre (1993). "Chromosome transmission and meiotic stability of sugarcane (*Saccharum* spp.) hybrid derivatives." Crop Science **33**(3): 600-606.
- Burrows, M. E., M. C. Caillaud, D. M. Smith, E. C. Benson, F. E. Gildow and S. M. Gray (2006). "Genetic regulation of *Polerovirus* and *Luteovirus* transmission in the aphid *Schizaphis graminum*." Phytopathology **96**(8): 828-837.
- Butterfield, M. (2007). Marker assisted breeding in sugarcane: a complex polyploid, University of Stellenbosch. **PhD Thesis**: 164pp.
- Caillaud, C. M., C. A. Dedryver, J. P. Di Pietro, J. C. Simon, F. Fima and B. Chaubet (1995). "Clonal variability in the response of *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae) to resistant and susceptible wheat." Bulletin of Entomological Research **85**(02): 189-195.
- Caillaud, M. C. and S. Via (2000). "Specialized Feeding Behavior Influences Both Ecological Specialization and Assortative Mating in Sympatric Host Races of Pea Aphids." The American Naturalist **156**(6): 16.
- Cardon, L. R. and J. I. Bell (2001). "Association study designs for complex diseases." Nature Reviews Genetics **2**(2): 91-99.
- Carletto, J., E. Lombaert, P. Chavigny, T. Brévault, L. Lapchin and F. Vanlerberghe-Masutti (2009). "Ecological specialization of the aphid *Aphis gossypii* Glover on cultivated host plants." Molecular Ecology **18**(10): 2198-2212.

- Carlson, C. S., M. A. Eberle, L. Kruglyak and D. A. Nickerson (2004). "Mapping complex disease loci in whole-genome association studies." Nature **429**(6990): 446-452.
- Castañeda, L. E., C. C. Figueroa, E. Fuentes-Contreras, H. M. Niemeyer and R. F. Nespolo (2010). "Physiological approach to explain the ecological success of 'superclones' in aphids: Interplay between detoxification enzymes, metabolism and fitness." Journal of Insect Physiology **56**(9): 1058-1064.
- Chatenet, M., C. Delage, M. Ripolles, M. Irey, B. E. L. Lockhart and P. Rott (2001). "Detection of Sugarcane yellow leaf virus in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture." Plant Disease **85**(11): 1177-1180.
- Chen, J.-Q., Y. Rahbe and B. Delobel (1999). "Effects of pyrazole compounds from melon on the melon aphid *Aphis gossypii*." Phytochemistry **50**(7): 1117-1122.
- Chen, J. Q., Y. Rahbé, B. Delobel, N. Sauvion, J. Guillaud and G. Febvay (1997). "Melon resistance to the aphid *Aphis gossypii*: behavioural analysis and chemical correlations with nitrogenous compounds." Entomologia Experimentalis et Applicata **85**: 33-44.
- Chiel, E., E. Zchori-Fein, M. Inbar, Y. Gottlieb, T. Adachi-Hagimori, S. E. Kelly, M. K. Asplen and M. S. Hunter (2009). "Almost there: transmission routes of bacterial symbionts between trophic levels." PLoS ONE **4**(3): e4767.
- Cilia, M., C. Tamborindeguy, T. Fish, K. Howe, T. Thannhauser and S. Gray (2011). "Genetics coupled to quantitative intact proteomics links heritable aphid and endosymbiont protein expression to circulative polerovirus transmission." Journal of virology **85**(5): 2148.
- Coeur d'Acier, A., G. Cocuzza, E. Jousselin, V. Cavalieri and S. Barbagallo (2008). "Molecular phylogeny and systematic in the genus *Brachycaudus* (Homoptera: Aphididae): insights from a combined analysis of nuclear and mitochondrial genes." Zoologica Scripta **37**(2): 175-193.
- Coeur d'Acier, A., E. Jousselin, J.-F. Martin and J.-Y. Rasplus (2007). "Phylogeny of the Genus *Aphis* Linnaeus, 1758 (Homoptera: Aphididae) inferred from mitochondrial DNA sequences." Molecular Phylogenetics and Evolution **42**: 598-611.
- Collins, N., C. Webb, S. Seah, J. Ellis, S. Hulbert and A. Pryor (1998). "The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize." Molecular Plant-Microbe Interactions **11**(10): 968-978.
- Comstock, J. C., J. E. Irvine and J. D. Miller (1994). "Yellow leaf syndrome appears on the United States Mainland." Sugar Journal(March 1994): 33-35.

- Comstock, J. C. and J. D. Miller (2004). "Yield comparisons: disease-free tissue-culture versus bud-propagated sugarcane plants and healthy versus yellow leaf infected plants." Journal-American-Society-of-Sugar-Cane-Technologists: 31-40.
- Comstock, J. C., J. D. Miller and R. J. Schnell (2001). "Incidence of *Sugarcane yellow leaf virus* in clones maintained in the world collection of sugarcane and related grasses at the United States National Repository in Miami, Florida." Sugar Tech **3**(4): 128-133.
- Cordeiro, G. M., F. Elliott, C. L. McIntyre, R. E. Casu and R. J. Henry (2006). "Characterisation of single nucleotide polymorphisms in sugarcane ESTs." Theoretical and Applied Genetics **113**(2): 331-343.
- D'Arcy, C. and L. Domier (2005). Virus taxonomy. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Luteoviridae. C. Fauquet, M. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L. Ball. New York, Elsevier Academic Press: 891-900.
- D'Hont, A. and J. Glaszmann (2001). Sugarcane genome analysis with molecular markers: a first decade of research, Australian Society of Sugar Cane Technologists.
- D'Hont, A., L. Grivet, P. Feldmann, J. Glaszmann, S. Rao and N. Berding (1996). "Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics." Molecular and General Genetics MGG **250**(4): 405-413.
- D'Hont, A., D. Ison, K. Alix, C. Roux and J. C. Glaszmann (1998). "Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes." Genome **41**(2): 221-225.
- D'Hont, A., F. Paulet and J. C. Glaszmann (2002). "Oligoclonal interspecific origin of 'North Indian' and 'Chinese' sugarcane." Chromosome Research **10**(3): 253-262.
- da Silva, J., R. J. Honeycutt, W. Burnquist, S. M. Aljanabi, M. E. Sorrells, S. D. Tanksley and B. W. S. Sobral (1995). "Saccharum spontaneum L. 'SES 208' genetic linkage map combining RFLP- and PCR-based markers." Molecular Breeding **1**(2): 165-179.
- Dangl, J. L. and J. D. G. Jones (2001). "Plant pathogens and integrated defence responses to infection." Nature **411**(6839): 826-833.
- Daniels, J. and B. Roach (1987). "Taxonomy and evolution." Sugarcane improvement through breeding: 7-84.
- Darwin, C. (1859). On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. London, UKpp.

- Daugrois, J., L. Grivet, D. Roques, J. Hoarau, H. Lombard, J. Glaszmann and A. D'Hont (1996). "A putative major gene for rust resistance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar 'R570'." Theoretical and Applied Genetics **92**(8): 1059-1064.
- Dawkins, R. and J. R. Krebs (1979). "Arms races between and within species." Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences **205**(1161): 489-511.
- de Ilarduya, O. M., Q. Xie and I. Kaloshian (2003). "Aphid-Induced Defense Responses in Mi-1-Mediated Compatible and Incompatible Tomato Interactions." Molecular Plant-Microbe Interactions **16**(8): 699-708.
- De Vos, M. and G. Jander (2009). "*Myzus persicae* (green peach aphid) salivary components induce defence responses in *Arabidopsis thaliana*." Plant, Cell & Environment **32**(11): 1548-1560.
- De Vries, S. C., G. W. J. Van de Ven, M. K. Van Ittersum and K. E. Giller (2010). "Resource use efficiency and environmental performance of nine major biofuel crops, processed by first-generation conversion techniques." Biomass and Bioenergy **34**(5): 588-601.
- Delatte, H., H. Holota, B. Reynaud and J. Dintinger (2006). "Characterisation of a quantitative resistance to vector transmission of *Tomato yellow leaf curl virus* in *Lycopersicon pimpinellifolium*." European Journal of Plant Pathology **114**(3): 245-253.
- Delmotte, F., B. Sabater-Muñoz, N. Prunier-Leterme, A. Latorre, P. Sunnucks, C. Rispe and J. C. Simon (2003). "Phylogenetic evidence for hybrid origins of asexual lineages in an aphid species." Evolution **57**(6): 1291-1303.
- Delp, G., T. Gradin, I. Ahman and L. M. V. Jonsson (2008). "Microarray analysis of the interaction between the aphid *Rhopalosiphum padi* and host plants reveals both differences and similarities between susceptible and partially resistant barley lines." Mol Genet Genomics.
- Dintinger, J., N. Boissot, F. Chiroleu, P. Hamon and B. Reynaud (2005). "Evaluation of maize inbreds for *Maize stripe virus* and *Maize mosaic virus* resistance: disease progress in relation to time and the cumulative number of planthoppers." Phytopathology **95**(6): 600-607.
- Dogimont, C., A. Bendahmane, V. Chovelon and N. Boissot (2010). "Host plant resistance to aphids in cultivated crops: Genetic and molecular bases, and interactions with aphid populations." Comptes Rendus Biologies **333**(6-7): 566-573.

- Dogimont, C., A. Bendahmane, M. Pitrat, E. Burget-Bigeard, L. Hagen, A. Le Menn, J. Pauquet, P. Rousselle, M. Caboche and V. Chovelon (2004). (EN) Gene resistant to *Aphis gossypii*, WO Patent WO/2004/072,109.
- Döring, T. and L. Chittka (2007). "Visual ecology of aphids—a critical review on the role of colours in host finding." Arthropod-Plant Interactions **1**(1): 3-16.
- Döring, T., S. Kirchner, S. Kühne and H. Saucke (2004). "Response of alate aphids to green targets on coloured backgrounds." Entomologia Experimentalis et Applicata **113**(1): 53-61.
- Drès, M. and J. Mallet (2002). "Host races in plant–feeding insects and their importance in sympatric speciation." Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences **357**(1420): 471.
- Du, B., W. Zhang, B. Liu, J. Hu, Z. Wei, Z. Shi, R. He, L. Zhu, R. Chen, B. Han and G. He (2009). "Identification and characterization of Bph14, a gene conferring resistance to brown planthopper in rice." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(52): 22163-22168.
- Dugravot, S., L. Brunissen, E. Létocart, W. F. Tjallingii, C. Vincent, P. Giordanengo and A. Cherqui (2007). "Local and systemic responses induced by aphids in *Solanum tuberosum* plants." Entomologia Experimentalis et Applicata **123**(3): 271-277.
- Eastop, V. (1973). "Deductions from the present day host plants of aphids and related insects." Insect/plant relationships: 157–178.
- Eastop, V. and H. R. Lambers (1976). "Survey of the World's Aphids." The Hague: W. Junk.
- Ehlers, K., M. Knoblauch and A. J. E. van Bel (2000). "Ultrastructural features of well-preserved and injured sieve elements: minute clamps keep the phloem transport conduits free for mass flow." Protoplasma **214**(1): 80-92.
- FAO. (2009). "Sugarcane Yield." Food and agricultural commodities production, from <http://faostat.fao.org>.
- Felsenstein, J. (1974). "The evolutionary advantage of recombination." Genetics **78**(2): 737.
- Fereres, A., G. Kampmeier and M. Irwin (1999). "Aphid attraction and preference for soybean and pepper plants infected with Potyviridae." Annals of the Entomological Society of America **92**(4): 542-548.
- Fereres, A. and A. Moreno (2009). "Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects." Virus Research **141**(2): 158-168.
- Ferrari, J., C. Scarborough and H. Godfray (2007). "Genetic variation in the effect of a facultative symbiont on host-plant use by pea aphids." Oecologia **153**(2): 323-329.

- Figuerola, C. C., J. C. Simon, J. F. Le Gallic, N. Prunier-Leterme, L. M. Briones, C. A. Dedryver and H. M. Niemeyer (2005). "Genetic structure and clonal diversity of an introduced pest in Chile, the cereal aphid *Sitobion avenae*." Heredity **95**(1): 24-33.
- Filichkin, S., S. Brumfield, T. Filichkin and M. Young (1997). "In vitro interactions of the aphid endosymbiotic SymL chaperonin with barley yellow dwarf virus." Journal of virology **71**(1): 569.
- Fitch, M. M. M., A. T. Lehrer, E. Komor and P. H. Moore (2001). "Elimination of *Sugarcane yellow leaf virus* from infected sugarcane plants by meristem tip culture visualized by tissue blot immunoassay." Plant Pathology **50**(6): 676-680.
- Flint-Garcia, S. A., J. M. Thornsberry and E. S. Buckler IV (2003). "Structure of linkage disequilibrium in plant." Annual Review of Plant Biology **54**(1): 357-374.
- Flynn, J., G. Powell, R. Perdomo, G. Montes, K. Quebedeaux and J. Comstock (2005). "Comparison of sugarcane disease incidence and yield of field-run, heat-treated, and tissue-culture based seedcane." Journal-American-Society-of-Sugar-Cane-Technologists: 88-100.
- Footitt, R. G., H. E. L. MAW, C. D. VON DOHLEN and P. D. N. HEBERT (2008). "Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes." Molecular Ecology Resources **8**(6): 1189-1201.
- Frankham, R. (2005). "Resolving the genetic paradox in invasive species." Heredity **94**(4): 385-385.
- Fuller, S. J., P. Chavigny, L. Lapchin and F. Vanlerberghe-Masutti (1999). "Variation in clonal diversity in glasshouse infestations of the aphid, *Aphis gossypii* Glover in southern France." Molecular Ecology **8**(11): 1867-1877.
- Gale, M. D. and K. M. Devos (1998). "Comparative genetics in the grasses." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(5): 1971.
- Gao, L. L., J. P. Anderson, J. P. Klingler, R. M. Nair, O. R. Edwards and K. B. Singh (2007). "Involvement of the octadecanoid pathway in bluegreen aphid resistance in *Medicago truncatula*." Molecular Plant-Microbe Interactions **20**(1): 82-93.
- Geng, Y. P., X. Y. Pan, C. Y. Xu, W. J. Zhang, B. Li, J. K. Chen, B. R. Lu and Z. P. Song (2007). "Phenotypic plasticity rather than locally adapted ecotypes allows the invasive alligator weed to colonize a wide range of habitats." Biological Invasions **9**(3): 245-256.

- Gilbert, J. C. and D. C. McGuire (1956). "Inheritance of resistance to severe root knot from *Meloidogyne incognita* in commercial type tomatoes." Proceedings of American Society for Horticulture Science **63**: 661-667.
- Gilchrist, G. W. and C. E. Lee (2007). "All stressed out and nowhere to go: does evolvability limit adaptation in invasive species?" Genetica **129**(2): 127-132.
- Givovich, A. and H. M. Niemeyer (1995). "Comparison of the effect of hydroxamic acids from wheat on five species of cereal aphids." Entomologia Experimentalis et Applicata **74**(2): 115-119.
- Glaszmann, J., P. Dufour, L. Grivet, A. D'Hont, M. Deu, F. Paulet and P. Hamon (1997). "Comparative genome analysis between several tropical grasses." Euphytica **96**(1): 13-21.
- Gottlieb, Y., E. Zchori-Fein, N. Mozes-Daube, S. Kontsedalov, M. Skaljic, M. Brumin, I. Sobol, H. Czosnek, F. Vavre and F. Fleury (2011). "The transmission efficiency of *Tomato yellow leaf curl virus* by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species." Journal of virology **84**(18): 9310.
- Gouyon, P. (1999). "Sex: a pluralist approach includes species selection.(One step beyond and it's good.)." Journal of Evolutionary Biology **12**: 1029-1030.
- Gray, S. and F. E. Gildow (2003). "Luteovirus-aphid interactions." Annual Review of Phytopathology **41**: 539-566.
- Grenfell, B. T., O. G. Pybus, J. R. Gog, J. L. N. Wood, J. M. Daly, J. A. Mumford and E. C. Holmes (2004). "Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens." Science **303**(5656): 327.
- Griffiths, D. C., J. A. Pickett and C. Woodcock (1982). "Behaviour of alatae of *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) on chemically treated surfaces after tethered flight." Bulletin of Entomological Research **72**(04): 687-693.
- Grimaldi, D. A. and M. S. Engel (2005). Evolution of the Insects, Cambridge University Presspp.
- Grisham, M. P., Y.-B. Pan, B. L. Legendre, M. A. Godshall and G. Eggleston (2001). "Effect of *Sugarcane yellow leaf virus* on sugarcane yield and juice quality." Proceedings of International Sugarcane Technologists **24**: 434-438.
- Grivet, L. (1995). Marquage moléculaire chez la canne à sucre (*Saccharum* spp.); décomposition d'une structure génétique complexe et application à l'amélioration variétale. Orsay, Université de Paris-Sud.

- Grivet, L. and P. Arruda (2002). "Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop." Current Opinion in Plant Biology **5**(2): 122-127.
- Grivet, L., A. d'Hont, D. Roques, P. Feldmann, C. Lanaud and J. C. Glaszmann (1996). "RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp.): genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid." Genetics **142**(3): 987.
- Grivet, L., J. Glaszmann and A. D'Hont (2006). "Molecular evidence of sugarcane evolution and domestication." Darwin's harvest: new approaches to the origins, evolution, and conservation of crops: 49.
- Grivet, L., J. C. Glaszmann, M. Vincentz, F. Da Silva and P. Arruda (2003). "ESTs as a source for sequence polymorphism discovery in sugarcane: example of the *Adh* genes." Theoretical and Applied Genetics **106**(2): 190-197.
- Guimarães, C. T., R. J. Honeycutt, G. R. Sills and B. W. S. Sobral (1999). "Genetic maps of *Saccharum officinarum* L. and *Saccharum robustum* Brandes & Jew. ex grassl." Genetics and Molecular Biology **22**(1): 125-132.
- Gupta, P. K., S. Rustgi and P. L. Kulwal (2005). "Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: present status and future prospects." Plant Molecular Biology **57**(4): 461-485.
- Hao, P., C. Liu, Y. Wang, R. Chen, M. Tang, B. Du, L. Zhu and G. He (2008). "Herbivore-induced callose deposition on the sieve plates of rice: an important mechanism for host resistance." Plant Physiology **146**(4): 1810-1820.
- Harrison, J. S., E. B. Mondor and W. Etges (2011). "Evidence for an Invasive Aphid "Superclone": Extremely Low Genetic Diversity in Oleander Aphid (*Aphis nerii*) Populations in the Southern United States." PLoS ONE **6**(3): e17524.
- Hashiba, T. and T. Misawa (1969). "Studies on the mechanism of aphid transmission of stylet-borne virus.(III) On the adherence of the virus to the stylet." Tohoku Journal of Agricultural Research **20**(4).
- Heffner, E. L., M. E. Sorrells and J. L. Jannink (2009). "Genomic Selection for Crop Improvement."
- Heinz, D. and T. Tew (1987). "Hybridization procedures." Sugarcane Improvement through Breeding. Elsevier, Amsterdam: 313–342.
- Heller-Uszynska, K., G. Uszynski, E. Huttner, M. Evers, J. Carlig, V. Caig, K. Aitken, P. Jackson, G. Piperidis, M. Cox, R. Gilmour, A. D'Hont, M. Butterfield, J.-C. Glaszmann and A. Kilian (In press). "Diversity Arrays Technology effectively reveals

- DNA polymorphism in a large and complex genome of sugarcane." Molecular Breeding: 1-19.
- Hewer, A., T. Will and A. J. E. van Bel (2010). "Plant cues for aphid navigation in vascular tissues." Journal of Experimental Botany **213**(23): 4030-4042.
- Hoarau, J. Y., B. Offmann, A. D'Hont, A. M. Risterucci, D. Roques, J. C. Glaszmann and L. Grivet (2001). "Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). I. Genome mapping with AFLP markers." Theoretical and Applied Genetics **103**(1): 84-97.
- Hogenhout, S. A., E. D. Ammar, A. E. Whitfield and M. G. Redinbaugh (2008). "Insect vector interactions with persistently transmitted viruses." Annual Review of Phytopathology **46**(1): 327-359.
- Hogenhout, S. A., R. A. L. Van der Hoorn, R. Terauchi and S. Kamoun (2009). "Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms." Molecular Plant-Microbe Interactions **22**(2): 115-122.
- Hulbert, S. H., C. A. Webb, S. M. Smith and Q. Sun (2001). "Resistance gene complexes: evolution and utilization." Annual Review of Phytopathology **39**(1): 285-312.
- Huyse, T., R. Poulin and A. Theron (2005). "Speciation in parasites: a population genetics approach." Trends in parasitology **21**(10): 469-475.
- Hwang, C. F. and V. M. Williamson (2003). "Leucine rich repeat mediated intramolecular interactions in nematode recognition and cell death signaling by the tomato resistance protein Mi." The Plant Journal **34**(5): 585-593.
- Ilic, K., P. J. SanMiguel and J. L. Bennetzen (2003). "A complex history of rearrangement in an orthologous region of the maize, sorghum, and rice genomes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(21): 12265.
- Irey, M. S., L. E. Baucum, K. S. Derrick, K. L. Manjunath and B. E. Lockhart (1997). Detection of the luteovirus associated with yellow leaf syndrome of sugarcane (YLS) by a reverse transcriptase polymerase chain reaction and incidence of YLS in commercial varieties in Florida. Proceedings of the ISSCT 5th Pathology and 2nd Molecular Biology Workshop, 3–11 May 1997, Durban, South Africa, ISSCT.
- Jaccoud, D., K. Peng, D. Feinstein and A. Kilian (2001). "Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping." Nucleic Acids Research **29**(4): e25.

- Jannoo, N., L. Grivet, N. Chantret, O. Garsmeur, J. C. Glaszmann, P. Arruda and A. D'Hont (2007). "Orthologous comparison in a gene rich region among grasses reveals stability in the sugarcane polyploid genome." The Plant Journal **50**(4): 574-585.
- Jannoo, N., L. Grivet, A. Dookun, A. D'Hont and J. C. Glaszmann (1999). "Linkage disequilibrium among modern sugarcane cultivars." Theoretical and Applied Genetics **99**(6): 1053-1060.
- Kaloshian, I., M. G. Kinsey, D. E. Ullman and V. M. Williamson (1997). "The impact of *Meul*-mediated resistance in tomato on longevity, fecundity and behavior of the potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*." Entomologia Experimentalis et Applicata **83**(2): 181-187.
- Kaloshian, I., M. G. Kinsey, V. M. Williamson and D. E. Ullman (2000). "Mi-mediated resistance against the Potato Aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae) limits sieve element ingestion." Environmental Entomology **29**(4): 690-695.
- Kaloshian, I. and L. L. Walling (2005). "Hemipterans as Plant Pathogens." Annual Review of Phytopathology **43**(1): 491-521.
- Kanazin, V., L. F. Marek and R. C. Shoemaker (1996). "Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean." Proceedings of the National Academy of Sciences **93**(21): 11746.
- Kang, J. H., F. Shi, A. D. Jones, M. D. Marks and G. A. Howe (2010). "Distortion of trichome morphology by the hairless mutation of tomato affects leaf surface chemistry." Journal of experimental botany **61**(4): 1053.
- Katis, N., J. Tsitsipis, M. Stevens and G. Powell (2007). Transmission of plant viruses. Aphids as crop pests. H. van Emden and R. Harrington. Wallingford, UK, CAB International: 353-390.
- Kikuchi, Y., T. Hosokawa and T. Fukatsu (2007). "Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation." Applied and environmental microbiology **73**(13): 4308.
- Kim, H. and S. Lee (2008). "A molecular phylogeny of the tribe Aphidini (Insecta: Hemiptera: Aphididae) based on the mitochondrial tRNA/COII, 12S/16S and the nuclear EF1 α genes." Systematic Entomology **33**(4): 711-721.
- Kim, H., W. Lee and S. Lee (2010). "Morphometric relationship, phylogenetic correlation, and character evolution in the species-rich genus *Aphis* (Hemiptera: Aphididae)." PLoS ONE **5**(7): e11608.

- Kim, K.-S., C. B. Hill, G. L. Hartman, M. A. R. Mian and B. W. Diers (2008). "Discovery of Soybean Aphid Biotypes." Crop Science **48**(3): 923-928.
- Kindlmann, P., V. Jarošík and A. Dixon (2007). Population dynamics. Aphids as crop pests. H. Emden and R. Harrington. London, UK, CABI: 311-329.
- Kirchner, S., T. Döring and H. Saucke (2005). "Evidence for trichromacy in the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulz.) (Hemiptera: Aphididae)." Journal of Insect Physiology **51**(11): 1255-1260.
- Klingler, J., R. Creasy, L. Gao, R. M. Nair, A. S. Calix, H. S. Jacob, O. R. Edwards and K. B. Singh (2005). "Aphid resistance in *Medicago truncatula* involves antixenosis and phloem-specific, inducible antibiosis, and maps to a single locus flanked by NBS-LRR resistance gene analogs." Plant Physiology **137**(4): 1445-55.
- Klingler, J., G. Powell, G. A. Thompson and R. Isaacs (1998). "Phloem specific aphid resistance in Cucumis melo line AR 5: effects on feeding behaviour and performance of *Aphis gossypii*." Entomologia Experimentalis et Applicata **86**(1): 79-88.
- Klingler, J. P., O. R. Edwards and K. B. Singh (2007). "Independent action and contrasting phenotypes of resistance genes against spotted alfalfa aphid and bluegreen aphid in *Medicago truncatula*." New Phytologist **173**(3): 630-640.
- Klingler, J. P., R. M. Nair, O. R. Edwards and K. B. Singh (2009). "A single gene, AIN, in *Medicago truncatula* mediates a hypersensitive response to both bluegreen aphid and pea aphid, but confers resistance only to bluegreen aphid." Journal of Experimental Botany **60**(14): 4115-4127.
- Knoblauch, M., G. A. Noll, T. Müller, D. Prüfer, I. Schneider-Hüther, D. Scharner, A. J. E. Van Bel and W. S. Peters (2003). "ATP-independent contractile proteins from plants." Nature Materials **2**(9): 600-603.
- Knoblauch, M. and A. J. E. van Bel (1998). "Sieve tubes in action." The Plant Cell Online **10**(1): 35.
- Kogan, M. and E. F. Ortman (1978). "Antixenosis - A new term proposed to define Painter's "nonpreference" modality of resistance." Bulletin of the Entomological Society of America **24**: 175-176.
- Kolbe, J. J., R. E. Glor, L. R. Schettino, A. C. Lara, A. Larson and J. B. Losos (2004). "Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard." Nature **431**(7005): 177-181.

- Komor, E. (2010). "Susceptibility of sugarcane, plantation weeds and grain cereals to infection by *Sugarcane yellow leaf virus* and selection by sugarcane breeding in Hawaii." European Journal of Plant Pathology **129**: 379-388.
- Komor, E., A. ElSayed and A. Lehrer (2010). "Sugarcane yellow leaf virus introduction and spread in Hawaiian sugarcane industry: Retrospective epidemiological study of an unnoticed, mostly asymptomatic plant disease." European Journal of Plant Pathology.
- Korimbocus, J., D. Coates, I. Barker and N. Boonham (2002). "Improved detection of Sugarcane yellow leaf virus using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay." Journal of Virological Methods **103**(2): 109-120.
- Lavergne, S. b. and J. Molofsky (2007). "Increased genetic variation and evolutionary potential drive the success of an invasive grass." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(10): 3883-3888.
- Lazzari, S., S. Starkey, J. Reese, A. Ray-Chandler, R. McCubrey and C. M. Smith (2009). "Feeding behavior of Russian Wheat Aphid (Hemiptera: Aphididae) biotype 2 in response to wheat genotypes exhibiting antibiosis and tolerance resistance." Journal of Economic Entomology **102**(3): 1291-1300.
- Le Cunff, L., O. Garsmeur, L. M. Raboin, J. Pauquet, H. Telismart, A. Selvi, L. Grivet, R. Philippe, D. Begum and M. Deu (2008). "Diploid/polyploid syntenic shuttle mapping and haplotype-specific chromosome walking toward a rust resistance gene (Bru1) in highly polyploid sugarcane (2n~12x~115)." Genetics **180**(1): 649.
- Leach, J. E., C. M. Vera Cruz, J. Bai and H. Leung (2001). "Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes." Annual Review of Phytopathology **39**(1): 187-224.
- Lee, C. E. (2002). "Evolutionary genetics of invasive species." Trends in Ecology & Evolution **17**(8): 386-391.
- Lee, W., H. Kim, J. Lim, H. R. A. N. Choi, Y. Kim, Y. S. U. Kim, J. Y. Ji, R. G. Footitt and S. Lee (2011). "Barcoding aphids (Hemiptera: Aphididae) of the Korean Peninsula: updating the global data set." Molecular Ecology Resources **11**(1): 32-37.
- Lehrer, A., K. Wu and E. Komor (2009). "Impact of Sugarcane yellow leaf virus on growth and sugar yield of sugarcane." Journal of General Plant Pathology **75**(4): 288-296.
- Leonardo, T. E. and E. B. Mondor (2006). "Symbiont modifies host life-history traits that affect gene flow." Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **273**(1590): 1079-1084.

- Leonardo, T. E. and G. T. Muiru (2003). "Facultative symbionts are associated with host plant specialization in pea aphid populations." Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences **270**(Suppl 2): S209.
- Li, C., D. Cox-Foster, S. M. Gray and F. Gildow (2001). "Vector specificity of *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) transmission: identification of potential cellular receptors binding BYDV-MAV in the aphid, *Sitobion avenae*." Virology **286**(1): 125-133.
- Li, Q., Q. G. Xie, J. Smith-Becker, D. A. Navarre and I. Kaloshian (2006). "Mi-1-Mediated aphid resistance involves salicylic acid and mitogen-activated protein kinase signaling cascades." Mol Plant Microbe Interact **19**(6): 655-64.
- Liu, X. Liu, Smith, C. Smith, Gill and B. Gill (2002). "Identification of microsatellite markers linked to Russian wheat aphid resistance genes *Dn4* and *Dn6*." Theoretical and Applied Genetics **104**(6): 1042-1048.
- Liu, X. M., C. M. Smith, B. S. Gill and V. Tolmay (2001). "Microsatellite markers linked to six Russian wheat aphid resistance genes in wheat." Theoretical and Applied Genetics **102**(4): 504-510.
- Llewellyn, K. S., H. D. Loxdale, R. Harrington, C. P. Brookes, S. J. Clark and P. Sunnucks (2003). "Migration and genetic structure of the grain aphid (*Sitobion avenae*) in Britain related to climate and clonal fluctuation as revealed using microsatellites." Molecular Ecology **12**(1): 21-34.
- Lockhart, B., M. Irey and J. Comstock (1996). Sugarcane bacilliform virus, sugarcane mild mosaic virus and sugarcane yellow leaf syndrome, Australian center for international agricultural research.
- Lockhart, B. E. and C. P. R. Cronjé (2000). Yellow leaf syndrome. A guide to sugarcane diseases. P. Rott, R. A. Bailey, J. C. Comstock, B. J. Croft and S. Saumtally. Montpellier, France, CIRAD and ISSCT: 291-295.
- Lombaert, E., J. Carletto, C. Piotte, X. Fauvergue, H. Lecoq, F. Vanlerberghe-Masutti and L. Lapchin (2009). "Response of the melon aphid, *Aphis gossypii*, to host-plant resistance: evidence for high adaptive potential despite low genetic variability." Entomologia Experimentalis et Applicata **133**: 46-56.
- Loureiro, M. E., M. H. P. Barbosa, F. J. F. Lopes and F. O. Silvério (2011). "Sugarcane Breeding and Selection for more Efficient Biomass Conversion in Cellulosic Ethanol." Routes to Cellulosic Ethanol: 199-239.
- Loxdale, H. D. and G. Lushai (2007). "2 Population Genetic Issues: The Unfolding Story Using Molecular Markers." Aphids as crop pests: 31.

- Lozier, J., R. Footitt, G. Miller, N. Mills and G. Roderick (2008). "Molecular and morphological evaluation of the aphid genus *Hyalopterus* Koch (Insecta: Hemiptera: Aphididae), with a description of a new species." Zootaxa **1688**: 1-19.
- Lu, Y., A. D'Hont, D. Walker, P. Rao, P. Feldmann and J. Glaszmann (1994). "Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single copy maize nuclear probes." Euphytica **78**(1): 7-18.
- Lushai, G., P. J. De Barro, O. David, T. N. Sherratt and N. Maclean (1998). "Genetic variation within a parthenogenetic lineage." Insect Molecular Biology **7**(4): 337-344.
- Lushai, G., H. D. Loxdale and J. A. Allen (2003). "The dynamic clonal genome and its adaptive potential." Biological Journal of the Linnean Society **79**(1): 193-208.
- Lynch, M., R. Bürger, D. Butcher and W. Gabriel (1993). "The mutational meltdown in asexual populations." Journal of heredity **84**(5): 339-344.
- Mangwende, T., M.-L. Wang, W. Borth, J. Hu, P. H. Moore, T. E. Mirkov and H. H. Albert (2009). "The P0 gene of Sugarcane yellow leaf virus encodes an RNA silencing suppressor with unique activities." Virology **384**(1): 38-50.
- Martin, B., J. Collar, W. Tjallingii and A. Fereres (1997). "Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses." Journal of General Virology **78**(10): 2701-2705.
- Martin, B., Y. RahbÉ and A. Fereres (2003). "Blockage of stylet tips as the mechanism of resistance to virus transmission by *Aphis gossypii* in melon lines bearing the Vat gene." Annals of Applied Biology **142**(2): 245-250.
- Maynard Smith, J. (1978). The evolution of sex, Cambridge University Press, Cambridgepp.
- McDonald, B. A. and C. Linde (2002). "Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance." Annual Review of Phytopathology **40**(1): 349-379.
- McIntyre, C. L., M. Jackson, G. M. Cordeiro, O. Amouyal, S. Hermann, K. Aitken, F. Elliott, R. Henry, R. Casu and G. Bonnett (2006). "The identification and characterisation of alleles of sucrose phosphate synthase gene family III in sugarcane." Molecular Breeding **18**(1): 39-50.
- McMartin, A. (1940). The sugar cane varieties of Natal.
- McMullen, M. and K. Simcox (1995). "Genomic organization of disease and insect resistance genes in maize." Molecular Plant-Microbe Interactions **8**: 811-815.
- Meuwissen, T., B. Hayes and M. Goddard (2001). "Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps." Genetics **157**(4): 1819.
- Meyer, J. (1989). Histoire du sucre, Editions Desjonquèrespp.

- Michelmore, R., I. Paran and R. Kesseli (1991). "Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88**(21): 9828.
- Michelmore, R. W. and B. C. Meyers (1998). "Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process." Genome Research **8**(11): 1113.
- Miles, P. W. (1999). "Aphid saliva." Biological Reviews **74**(01): 41-85.
- Miller, W. A. and L. Rasochová (1997). "Barley yellow dwarf viruses." Annual Review of Phytopathology **35**: 167-190.
- Milligan, S. B., J. Bodeau, J. Yaghoobi, I. Kaloshian, P. Zabel and V. M. Williamson (1998). "The root knot nematode resistance gene Mi from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes." Plant Cell **10**(8): 1307-19.
- Ming, R., S. C. Liu, Y. R. Lin, J. Da Silva, W. Wilson, D. Braga, A. Van Deynze, T. Wenslaff, K. Wu and P. Moore (1998). "Detailed alignment of Saccharum and Sorghum chromosomes: comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes." Genetics **150**(4): 1663.
- Mittal, S., L. S. Dahleen and D. Mornhinweg (2008). "Locations of Quantitative Trait Loci Conferring Russian Wheat Aphid Resistance in Barley Germplasm STARS-9301B." Crop Science **48**(4): 1452-1458.
- Mittal, S., L. S. Dahleen and D. Mornhinweg (2009). "Barley germplasm STARS-9577B lacks a russian wheat aphid resistance allele at a Quantitative Trait Locus present in STARS-9301B." Crop Science **49**(6): 1999-2004.
- Monfreda, C., N. Ramankutty and J. A. Foley (2008). "Farming the planet: 2. Geographic distribution of crop areas, yields, physiological types, and net primary production in the year 2000." Global Biogeochemical Cycles **22**(1): 1-19.
- Moonan, F. and T. E. Mirkov (2002). "Analyses of genotypic diversity among North, South, and Central American isolates of Sugarcane yellow leaf virus: evidence for colombian origins and for intraspecific spatial phylogenetic variation." Journal-of-Virology **76**(3): 1339-1348.
- Moran, N. A. (1989). "A 48 million year old aphid-host plant association and complex life cycle: biogeographic evidence." Science **245**(4914): 173.
- Moran, N. A. (1992). "The evolution of aphid life cycles." Annual Review of Entomology **37**(1): 321-348.

- Moran, N. A. and H. E. Dunbar (2006). "Sexual acquisition of beneficial symbionts in aphids." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(34): 12803-12806.
- Moran, N. A., M. A. Munson, P. Baumann and H. Ishikawa (1993). "A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts." Proceedings: Biological Sciences: 167-171.
- Moran, P. J. and G. A. Thompson (2001). "Molecular Responses to Aphid Feeding in Arabidopsis in Relation to Plant Defense Pathways." Plant Physiology **125**(2): 1074-1085.
- Morgante, M. and F. Salamini (2003). "From plant genomics to breeding practice." Current Opinion in Biotechnology **14**(2): 214-219.
- Moutia, J. F. Y. and S. Saumtally (2001). "Diagnosis of sugarcane yellow leaf virus in cane juice and the effect of hot water treatment on its control." International-Society-of-Sugar-Cane-Technologists-Proceedings-of-the-XXIV-Congress,-Brisbane,-Australia,-17-21-September-2001-Volume-2.
- Mrode, R. and R. Thompson (2005). Linear models for the prediction of animal breeding values, Cabipp.
- Müller, C. and M. Riederer (2005). "Plant surface properties in chemical ecology." Journal of Chemical Ecology **31**(11): 2621-2651.
- Müller, H. J. (1958). "The behaviour of Aphis fabae in selecting its host plants, especially different varieties of Vicia faba." Entomologia Experimentalis et Applicata **1**(1): 66-72.
- Naidu, K. and T. Sreenivasan (1987). Conservation of sugarcane germplasm.
- Ni, X., S. S. Quisenberry, B. D. Siegfried and K. W. Lee (1998). Influence of cereal leaf epicuticular wax on Diuraphis noxia probing behavior and nymphoposition, Blackwell Science Ltd. **89**: 111-118.
- Nibouche, S., L. Raboin, J. Y. Hoarau, A. D'Hont and L. Costet (2010). "Quantitative trait loci for sugarcane resistance to the spotted stem borer *Chilo sacchariphagus*." Molecular Breeding: 1-7.
- Nombela, G., V. M. Williamson and M. Muñoz (2003). "The Root-Knot Nematode resistance gene Mi-1.2 of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*." Molecular Plant-Microbe Interactions **16**(7): 645-649.
- Nordborg, M. and S. Tavaré (2002). "Linkage disequilibrium: what history has to tell us." Trends in Genetics **18**(2): 83-90.

- Nottingham, S. F., J. Hardie, G. W. Dawson, A. J. Hick, J. A. Pickett, L. J. Wadhams and C. M. Woodcock (1991). "Behavioral and electrophysiological responses of aphids to host and nonhost plant volatiles." Journal of Chemical Ecology **17**(6): 1231-1242.
- Offmann, B. (2000). Caractérisation et analyse génétique de la résistance de la canne à sucre à *Xanthomonas albilineans*. Saint Denis, France, Université de la Réunion. **PhD**: 116.
- Oliver, K. M., P. H. Degnan, G. R. Burke and N. A. Moran (2010). "Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits." Annual Review of Entomology **55**: 247-266.
- Orr, H. A. (1995). "The population genetics of speciation: the evolution of hybrid incompatibilities." Genetics **139**(4): 1805.
- Painter, R. H. (1951). Insect Resistance in Crop Plants. Lawrence, KS, USA, University of Kansas Press, 520pp.
- Papura, D., E. Jacquot, C. A. Dedryver, S. Luche, G. Riault, M. Bossis and T. Rabilloud (2002). "Two-dimensional electrophoresis of proteins discriminates aphid clones of *Sitobion avenae* differing in BYDV-PAV transmission." Archives of Virology **147**(10): 1881-1898.
- Park, K. C. and J. Hardie (2002). "Functional specialisation and polyphenism in aphid olfactory sensilla." Journal of Insect Physiology **48**(5): 527-535.
- Park, S.-J., Y. Huang and P. Ayoubi (2006). "Identification of expression profiles of sorghum genes in response to greenbug phloem-feeding using cDNA subtraction and microarray analysis." Planta **223**: 932-947.
- Parmessur, Y., S. Aljanabi, S. Saumtally and S. Dookun, A (2002). "*Sugarcane yellow leaf virus* and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture." Plant Pathology **51**(5): 561-566.
- Pascal, T., F. Pfeiffer, J. Kervella, J. P. Lacroze, M. H. Sauge and W. E. Weber (2002). "Inheritance of green peach aphid resistance in the peach cultivar 'Rubira'." Plant breeding **121**(5): 459-461.
- Paterson, A. H. (2006). "Leafing through the genomes of our major crop plants: strategies for capturing unique information." Nature Reviews Genetics **7**(3): 174-184.
- Peccoud, J., C. Figueroa, A. Silva, C. Ramirez, L. Mieuzet, J. Bonhomme, S. Stoeckel, M. Plantegenest and J. C. SIMON (2008). "Host range expansion of an introduced insect pest through multiple colonizations of specialized clones." Molecular Ecology **17**(21): 4608-4618.

- Peccoud, J., A. Ollivier, M. Plantegenest and J.-C. Simon (2009). "A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(18): 7495-7500.
- Peccoud, J., J. C. Simon, C. von Dohlen, A. Coeur d'Acier, M. Plantegenest, F. Vanlerberghe-Masutti and E. Jousselin (2010). "Evolutionary history of aphid-plant associations and their role in aphid diversification." Comptes Rendus Biologies.
- Peiffer, M., F. Gildow and S. Gray (1997). "Two distinct mechanisms regulate luteovirus transmission efficiency and specificity at the aphid salivary gland." Journal of General Virology **78**(3): 495.
- Pettersson, J., W. F. Tjallingii and J. Hardie (2007). Host-plant Selection and Feeding. Aphids as crop pests. London, CABI: 87-113.
- Pfalz, M., H. Vogel and J. Kroymann (2009). "The Gene Controlling the Indole Glucosinolate Modifier1 Quantitative Trait Locus Alters Indole Glucosinolate Structures and Aphid Resistance in Arabidopsis." Plant Cell **21**(3): 985-999.
- Pimentel, D., L. Lach, R. Zuniga and D. Morrison (2000). "Environmental and economic costs of nonindigenous species in the United States." BioScience **50**(1): 53-65.
- Pinto, L. R., K. M. Oliveira, E. C. Ulian, A. A. F. Garcia and A. P. de Souza (2004). "Survey in the sugarcane expressed sequence tag database (SUCEST) for simple sequence repeats." Genome **47**(5): 795-804.
- Piperidis, G., N. Piperidis and A. D'Hont (2010). "Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane." Molecular Genetics and Genomics: 1-9.
- Pitrat, M. and H. Lecoq (1980). "Inheritance of resistance to Cucumber Mosaic Virus transmission by *Aphis gossypii* in *Cucumis melo*." Phytopathology **72**: 958-961.
- Pitrat, M., H. Lecoq and M. Ricard (1982). "Relations génétiques entre les résistances par non-acceptation et par antibiose du melon à *Aphis gossypii*. Recherche de liaisons avec d'autres gènes." Agronomie **2**(6): 503-508.
- Plucknett, D., J. Evenson and W. Sanford (1970). "Ratoon Cropping 1." Advances in Agronomy **22**: 285-330.
- Powell, G. (1991). "Cell membrane punctures during epidermal penetrations by aphids: consequences for the transmission of two potyviruses." Annals of Applied Biology **119**(2): 313-321.
- Powell, G. (2005). "Intracellular salivation is the aphid activity associated with inoculation of non-persistently transmitted viruses." Journal of General Virology **86**(2): 469.

- Powell, G. and J. Hardie (2000). "Host selection behaviour by genetically identical aphids with different plant preferences." Physiological Entomology **25**(1): 54-62.
- Powell, G., S. Maniar, J. Pickett and J. Hardie (1999). "Aphid responses to non-host epicuticular lipids." Entomologia Experimentalis et Applicata **91**(1): 115-123.
- Powell, G., C. R. Tosh and J. Hardie (2006). "Host plant selection by aphids: behavioral, evolutionary, and applied perspectives." Annual Review of Entomology **51**(1): 309-330.
- Power, A. and S. Gray (1995). "Aphid transmission of barley yellow dwarf viruses: interactions between viruses, vectors, and host plants." Barley yellow dwarf **40**: 259-291.
- Power, A. G. and A. S. Flecker (2008). "The role of vector diversity on disease dynamics." Infectious Disease Ecology: Effects of Ecosystems on Disease and of Disease on Ecosystems: 30-47.
- Prado, E. and W. F. Tjallingii (1994). "Aphid activities during sieve element punctures." Entomologia Experimentalis et Applicata **72**(2): 157-165.
- Price, S. (1957). "Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. III. Chromosome numbers in interspecific hybrids." Botanical Gazette **118**(3): 146-159.
- Price, S. (1965). Cytology of *Saccharum robustum* and related sympatric species and natural hybrids, US Dept. of Agriculturepp.
- Price, S. (1968). "Cytology of Chinese and North Indian sugarcane." Economic Botany **22**(2): 155-164.
- Qubbaj, T., A. Reineke and C. Zebitz (2005). "Molecular interactions between rosy apple aphids, *Dysaphis plantaginea*, and resistant and susceptible cultivars of its primary host *Malus domestica*." Entomologia Experimentalis et Applicata **115**(1): 145-152.
- Raboin, L.-M., J. Pauquet, M. Butterfield, A. D'Hont and J.-C. Glaszmann (2008). "Analysis of genome-wide linkage disequilibrium in the highly polyploid sugarcane." Theoretical and Applied Genetics **116**(5): 701-714.
- Raboin, L., K. Oliveira, L. Lecunff, H. Telismart, D. Roques, M. Butterfield, J. Hoarau and A. D'Hont (2006). "Genetic mapping in sugarcane, a high polyploid, using bi-parental progeny: identification of a gene controlling stalk colour and a new rust resistance gene." Theoretical and Applied Genetics **112**(7): 1382-1391.
- Raboin, L. M. (2005). Génétique de la résistance au charbon de la canne à sucre causé par *Ustilago scitaminea* : caractérisation de la diversité génétique du pathogène, cartographie de QTL dans un croisement bi-parental et étude d'associations dans une

- population de cultivars modernes. Montpellier, France, ENSAM. **Thèse de Doctorat:** 119.
- Rafalski, A. and M. Morgante (2004). "Corn and humans: recombination and linkage disequilibrium in two genomes of similar size." Trends in Genetics **20**(2): 103-111.
- Rafalski, J. A. (2010). "Association genetics in crop improvement." Current Opinion in Plant Biology **13**(2): 174-180.
- Rands, R. and E. Abbott (1964). Sereh. Sugarcane Diseases of the World. C. Hughes, E. Abbott and C. Wismer. Amsterdam, Elsevier. **2**: 183–189.
- Rassaby, L., J. C. Girard, M. S. Irey, B. E. L. Lockhart and P. Rott (1999). "Survey of sugarcane yellow leaf syndrome in Réunion Island." Sugar Cane: 16-18.
- Rassaby, L., J. C. Girard, O. Lemaire, L. Costet, M. S. Irey, H. Kodja, B. E. L. Lockhart and P. Rott (2004). "Spread of *Sugarcane yellow leaf virus* in sugarcane plants and fields on the island of Reunion." Plant-Pathology **53**(1): 117-125.
- Rassaby, L., J. C. Girard, P. Letourmy, J. Chaume, M. S. Irey, B. E. L. Lockhart, H. Kodja and P. Rott (2003). "Impact of *Sugarcane yellow leaf virus* on sugarcane yield and juice quality in Réunion Island." European Journal of Plant Pathology **109**: 459-466.
- Remaudiere, G. (1985). Contribution à l'écologie des aphides africains, Food & Agriculture Org.pp.
- Remaudière, G. and M. Remaudière (1997a). Catalogue des Aphididae du monde, Institut national de la recherche agronomiquepp.
- Remaudière, G. and M. Remaudière (1997b). Catalogue of the world's Aphididae. Paris, France, INRApp.
- Ricaud, C. (1968). "Yellow wilt of sugarcane in Eastern Africa." Sugarcane Pathol. Newsl **1**: 45-49.
- Rispe, C. and J.-S. Pierre (1998). "Coexistence between Cyclical Parthenogens, Obligate Parthenogens, and Intermediates in a Fluctuating Environment." Journal of Theoretical Biology **195**(1): 97-110.
- Rispe, C., J. S. Pierre, J. C. Simon and P. H. Gouyon (1998). "Models of sexual and asexual coexistence in aphids based on constraints." Journal of Evolutionary Biology **11**(6): 685-701.
- Roman, J. and J. A. Darling (2007). "Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions." Trends in Ecology & Evolution **22**(9): 454-464.

- Rossi, M., P. G. Araujo, F. Paulet, O. Garsmeur, V. M. Dias, H. Chen, M. A. Van Sluys and A. D'Hont (2003). "Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane." Mol Genet Genomics **269**(3): 406-19.
- Rossi, M., F. L. Goggin, S. B. Milligan, I. Kaloshian, D. E. Ullman and V. M. Williamson (1998). "The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(17): 9750-9754.
- Rott, P., T. E. Mirkov, S. Schenck and J. C. Girard (2008). "Recent advances in research on *Sugarcane yellow leaf virus*, the causal agent of sugarcane yellow leaf." Sugar Cane International **26**: 18-27.
- Ruiz, M., M. Rouard, L. M. Raboin, M. Lartaud, P. Lagoda and B. Courtois (2004). "TropGENE DB, a multi tropical crop information system." Nucleic Acids Research **32**(suppl 1): D364.
- Sakai, A. K., F. W. Allendorf, J. S. Holt, D. M. Lodge, J. Molofsky, K. A. With, S. Baughman, R. J. Cabin, J. E. Cohen and N. C. Ellstrand (2001). "The Population Biology of Invasive Species." Annual Review of Ecology and Systematics: 305-332.
- Sandström, J., J. Russell, J. White and N. Moran (2001). "Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids." Molecular Ecology **10**(1): 217-228.
- Sarria, E. V., E. G. González, A. I. López-Sesé, A. C. Fereres and M. L. Gómez-Guillamón (2009). "Hypersensitive response to *Aphis gossypii* Glover in melon genotypes carrying the Vat gene." Journal of experimental botany **60**(11): 3269.
- Sauge, M.-H., J. Kervella and T. Pascal (1998). "Settling behaviour and reproductive potential of the green peach aphid *Myzus persicae* on peach varieties and a related wild *Prunus*." Entomologia Experimentalis et Applicata **89**(3): 233-242.
- Sauge, M.-H., J.-P. Lacroze, J.-L. Poëssel, T. Pascal and J. Kervella (2002). "Induced resistance by *Myzus persicae* in the peach cultivar 'Rubira'." Entomologia Experimentalis et Applicata **102**(1): 29-37.
- Scagliusi, M. S. and B. E. Lockhart (1997). Transmission, characterization and serology of sugarcane yellow leaf luteovirus. Proceedings of the ISSCT 5th Pathology and 2nd Molecular Biology Workshop.
- Scagliusi, S. M. and B. E. L. Lockhart (2000). "Transmission, characterization, and serology of a luteovirus associated with yellow leaf syndrom of sugarcane." Phytopathology **90**: 120-124.

- Schenck, S. (1990). Yellow leaf syndrome—a new sugarcane disease. In: Annual Report 1990 of the Hawaiian Sugar Planters Association: 38.
- Schenck, S. (1997). "Advances in control of yellow leaf syndrome." Hawaii Agriculture Research Center, Pathology Report **67**: 1-4.
- Schenck, S., J. S. Hu and B. E. Lockhart (1997). "Use of a tissue blot immunoassay to determine the distribution of *Sugarcane yellow leaf virus* in Hawaii." Sugar Cane **4**: 5-8.
- Schenck, S. and A. T. Lehrer (2000). "Factors affecting the transmission and spread of *Sugarcane yellow leaf virus*." Plant Disease **84**(10): 1085-1088.
- Schluter, D. (2001). "Ecology and the origin of species." Trends in Ecology & Evolution **16**(7): 372-380.
- Seah, S., A. C. Telleen and V. M. Williamson (2007). "Introgressed and endogenous Mi-1 gene clusters in tomato differ by complex rearrangements in flanking sequences and show sequence exchange and diversifying selection among homologues." Theoretical and Applied Genetics **114**(7): 1289-1302.
- Seddas, P., S. Boissinot, J. M. Strub, A. Van Dorsselaer, M. H. V. Van Regenmortel and F. Pattus (2004). "Rack-1, GAPDH3, and actin: proteins of *Myzus persicae* potentially involved in the transcytosis of *Beet western yellows virus* particles in the aphid." Virology **325**(2): 399-412.
- Sexton, J. P., J. K. McKay and A. Sala (2002). "Plasticity and genetic diversity may allow saltcedar to invade cold climates in North America." Ecological Applications **12**(6): 1652-1660.
- Shufran, K. A. and T. L. Payton (2009). "Limited Genetic Variation Within and Between Russian Wheat Aphid (Hemiptera: Aphididae) Biotypes in the United States." Journal of Economic Entomology **102**(1): 440-445.
- Simmons, A., D. McGrath and G. Gurr (2005). "Trichome characteristics of F1 *Lycopersicon esculentum* x *L. cheesmanii* f. *minor* and *L. esculentum* x *L. pennellii* hybrids and effects on *Myzus persicae*." Euphytica **144**(3): 313-320.
- Simon, J.-C., C. Rispe and P. Sunnucks (2002). "Ecology and evolution of sex in aphids." Trends in Ecology & Evolution **17**(1): 34-39.
- Simon, J.-C., S. Stoeckel and D. Tagu (2010). "Evolutionary and functional insights into reproductive strategies of aphids." Comptes Rendus Biologies **333**(6-7): 488-496.

- Singh, B. U., P. G. Padmaja and N. Seetharama (2004). "Biology and management of the sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Homoptera: Aphididae), in sorghum: a review." Crop Protection **23**(9): 739-755.
- Smith, G., Z. Borg, B. E. Lockhart, K. S. Braithwaite and M. J. Gibbs (2000). "*Sugarcane Yellow Leaf Virus*: a novel member of the Luteoviridae that probably arose by inter-species recombination." Journal of General Virology **81**: 1865-1869.
- Smith, M. C. and E. V. Boyko (2007). "The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status." Entomologia Experimentalis et Applicata **122**: 1-16.
- Socol, C. R., L. P. S. Vandenberghe, A. B. P. Medeiros, S. G. Karp, M. Buckeridge, L. P. Ramos, A. P. Pitarelo, V. Ferreira-Leitão, L. M. F. Gottschalk and M. A. Ferrara (2011). "Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil." Bioresource technology **101**(13): 4820-4825.
- Sreenivasan, T., B. Ahloowalia and D. Heinz (1987). "Cytogenetics of sugarcane." Sugarcane Improvement through Breeding. Elsevier, Amsterdam: 211–253.
- Stevenson, G. C. (1965). "Genetics and breeding of sugar cane." Genetics and breeding of sugar cane.
- Stoner, K. A. (1992). "Density of imported cabbage worms (Lepidoptera: Pieridae), cabbage aphids (Homoptera: Aphididae), and flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) on glossy and trichome-bearing lines of *Brassica oleracea*." Journal of Economic Entomology **85**(3): 1023-1030.
- Stout, M. J., K. V. Workman, R. M. Bostock and S. S. Duffey (1997). "Specificity of induced resistance in the tomato, *Lycopersicon esculentum*." Oecologia **113**(1): 74-81.
- Sunnucks, P., P. J. D. Barro, G. Lushai, N. MacLean and D. Hales (1997). "Genetic structure of an aphid studied using microsatellites: cyclic parthenogenesis, differentiated lineages and host specialization." Molecular Ecology **6**(11): 1059-1073.
- Tanguy, S. and C. A. Dedryver (2009). "Reduced BYDV–PAV transmission by the grain aphid in a *Triticum monococcum* line." European Journal of Plant Pathology **123**(3): 281-289.
- Thompson, G. A. and F. L. Goggin (2006). "Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects." Journal of Experimental Botany **57**(4): 755-766.
- Tjallingii, W. F. (2006). "Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses." Journal of Experimental Botany **57**(4): 739-745.

- Tjallingii, W. F. and B. Gabrys (1999). "Anomalous stylet punctures of phloem sieve elements by aphids." Entomologia Experimentalis et Applicata **91**(1): 97-103.
- Tjallingii, W. F. and T. Hogen Esch (1993). "Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals." Physiological Entomology **18**(3): 317-328.
- Tosh, C. R., G. Powell, N. D. Holmes and J. Hardie (2003). "Reproductive response of generalist and specialist aphid morphs with the same genotype to plant secondary compounds and amino acids." Journal of Insect Physiology **49**(12): 1173-1182.
- Tsuchida, T., R. Koga and T. Fukatsu (2004). "Host plant specialization governed by facultative symbiont." Science **303**(5666): 1989.
- Tsuchida, T., R. Koga, S. Matsumoto and T. Fukatsu (2011). "Interspecific symbiont transfection confers a novel ecological trait to the recipient insect." Biology Letters **7**(2): 245-248.
- Turelli, M., N. H. Barton and J. A. Coyne (2001). "Theory and speciation." Trends in Ecology & Evolution **16**(7): 330-343.
- van den Heuvel, J. F. J. M., M. Verbeek and F. van der Wilk (1994). "Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*." Journal of General Virology **75**(10): 2559-2565.
- van Emden, H. (2007). Host-plant resistance. Aphids as crop pests. H. van Emden and R. Harrington. Wallingford, UK, CAB International: 447-468.
- Varshney, R. K., A. Graner and M. E. Sorrells (2005). "Genomics-assisted breeding for crop improvement." Trends in Plant Science **10**(12): 621-630.
- Vavre, F., F. Fleury, D. Lepetit, P. Fouillet and M. Boulétreau (1999). "Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations." Molecular Biology and Evolution **16**(12): 1711.
- Vega, J., S. M. M. Scagliusi and E. C. Ulian (1997). "Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: Evidence of association with a luteovirus." Plant Disease **81**: 21-26.
- Via, S. (1984). "The quantitative genetics of polyphagy in an insect herbivore. I. Genotype-environment interaction in larval performance on different host plant species." Evolution **38**(4): 881-895.
- Victoria, J., M. Avellaneda, J. Angel and M. Guzmán (2005). Resistance to sugarcane yellow leaf virus in Colombia.
- Viswanathan, R., M. Balamuralikrishnan and R. Karuppaiah (2008). "Identification of three genotypes of *Sugarcane yellow leaf virus* causing yellow leaf disease from India and their molecular characterization." Virus Genes **37**: 368-379.

- von Dohlen, C. D. and N. A. Moran (2000). "Molecular data support a rapid radiation of aphids in the Cretaceous and multiple origins of host alternation." Biological Journal of the Linnean Society **71**(4): 689-717.
- Vorburger, C., M. Lancaster and P. Sunnucks (2003). "Environmentally related patterns of reproductive modes in the aphid *Myzus persicae* and the predominance of two 'superclones' in Victoria, Australia." Molecular Ecology **12**(12): 3493-3504.
- Waclawovsky, A. J., P. M. Sato, C. G. Lembke, P. H. Moore and G. M. Souza (2010). "Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content." Plant Biotechnology Journal **8**(3): 263-276.
- Walling, L. L. (2000). "The Myriad Plant Responses to Herbivores." Journal of Plant Growth Regulation **19**(2): 195-216.
- Walling, L. L. (2008). "Avoiding Effective Defenses: Strategies Employed by Phloem-Feeding Insects." Plant Physiology **146**(3): 859-866.
- Wang, M. Q. and G. H. Zhou (2010). "A near-complete genome sequence of a distinct isolate of Sugarcane yellow leaf virus from China, representing a sixth new genotype." Virus Genes.
- Webster, B., T. Bruce, J. Pickett and J. Hardie (2010). "Volatiles functioning as host cues in a blend become nonhost cues when presented alone to the black bean aphid." Animal Behaviour **79**(2): 451-457.
- Webster, J., C. Inayatullah, M. Hamissou and K. Mirkes (1994). "Leaf pubescence effects in wheat on yellow sugarcane aphids and greenbugs (Homoptera: Aphididae)." Journal of Economic Entomology **87**(1): 231-240.
- Wei, X., P. Jackson, C. McIntyre, K. Aitken and B. Croft (2006). "Associations between DNA markers and resistance to diseases in sugarcane and effects of population substructure." Theoretical and Applied Genetics **114**(1): 155-164.
- Wei, X., P. A. Jackson, S. Hermann, A. Kilian, K. Heller-Uszynska and E. Deomano (2010). "Simultaneously accounting for population structure, genotype by environment interaction, and spatial variation in marker-trait associations in sugarcane." Genome **53**: 973-981.
- Welch, D. B. M., C. Ricci and M. Meselson (2009). "Bdelloid rotifers: progress in understanding the success of an evolutionary scandal." Lost Sex: 259-279.
- Wenzl, P., J. Carling, D. Kudrna, D. Jaccoud, E. Huttner, A. Kleinhofs and A. Kilian (2004). "Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley."

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(26): 9915.
- White, W. H. (1990). "Yellow Sugarcane Aphid (Homoptera: Aphididae) resistance mechanisms in selected sugarcane cultivars." Journal of Economic Entomology **83**: 2111-2114.
- Whitmarsh, J. and J. Govindjee (1999). "The photosynthetic process." Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis. G. Singhal, G. Renger, S. Sopory, K.-D. Irrgang, and Govindjee, editors. Narosa Publishers, New Delhi: 11–51.
- Will, T., A. Hewer and A. J. E. Van Bel (2008). "A novel perfusion system shows that aphid feeding behaviour is altered by decrease of sieve tube pressure." Entomologia Experimentalis et Applicata **127**(3): 237-245.
- Will, T., W. F. Tjallingii, A. Thönnessen and A. J. E. van Bel (2007). "Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(25): 10536-10541.
- Will, T. and A. J. E. van Bel (2006). "Physical and chemical interactions between aphids and plants." Journal of Experimental Botany **57**(4): 729-737.
- Williams, I. and A. Dixon (2007). Life cycles and polymorphism. Aphids as crop pests. H. Van Emden and R. Harrington. Wallingford, UK, CAB International: 69-85.
- Wilson, A., P. Sunnucks and D. Hales (2003). "Heritable genetic variation and potential for adaptive evolution in asexual aphids (Aphidoidea)." Biological Journal of the Linnean Society **79**: 115-135.
- Wittenberg, A. H. J., T. Lee, C. Cayla, A. Kilian, R. G. F. Visser and H. J. Schouten (2005). "Validation of the high-throughput marker technology DArT using the model plant *Arabidopsis thaliana*." Molecular Genetics and Genomics **274**(1): 30-39.
- Wool, D. and D. Hales (1996). "Previous infestation affects recolonization of cotton by *Aphis gossypii*: induced resistance or plant damage?" Phytoparasitica **24**(1): 39-48.
- Wroblewski, T., U. Piskurewicz, A. Tomczak, O. Ochoa and R. W. Michelmore (2007). "Silencing of the major family of NBS-LRR encoding genes in lettuce results in the loss of multiple resistance specificities." The Plant Journal **51**(5): 803-818.
- Wu, K., W. Burnquist, M. Sorrells, T. Tew, P. Moore and S. Tanksley (1992). "The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments." Theoretical and Applied Genetics **83**(3): 294-300.

- Xia, L., K. Peng, S. Yang, P. Wenzl, M. Carmen de Vicente, M. Fregene and A. Kilian (2005). "DART for high-throughput genotyping of cassava (*Manihot esculenta*) and its wild relatives." Theoretical and Applied Genetics **110**(6): 1092-1098.
- Yang, X., T. Thannhauser, M. Burrows, D. Cox-Foster, F. E. Gildow and S. M. Gray (2008). "Coupling genetics and proteomics to identify aphid proteins associated with vector-specific transmission of polerovirus (luteoviridae)." Journal of virology **82**(1): 291.
- Zarpas, K. D., J. T. Margaritopoulos, L. Stathi and J. A. Tsitsipis (2006). "Performance of cotton aphid *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) lineages on cotton varieties." International Journal of Pest Management **52**: 225-232.
- Zchori-Fein, E. and S. J. Perlman (2004). Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods, Blackwell Science Ltd. **13**: 2009-2016.
- Zehntner, L. (1897). "Overzicht van de Zieken van het Suikerriet op Java." Mededelingen van het Proefstation "Oost-Java". Nieuwe Serie **37**: 525–575.
- Zepeda-Paulo, F. A., J. C. Simon, C. C. Ramírez, E. Fuentes-Contreras, J. T. Margaritopoulos, A. C. C. Wilson, C. E. Sorenson, L. M. Briones, R. Azevedo, D. V. Ohashi, C. Lacroix, L. Glais and C. C. Figueroa (2010). "The invasion route for an insect pest species: the tobacco aphid in the New World." Molecular Ecology **19**(21): 4738-4752.
- Zhou, G., J. Li, D. Xu, W. Shen and H. Deng (2006). "Occurrence of Sugarcane yellow leaf virus in South China and its transmission by the sugarcane-colonizing aphid, *Ceratovacuna lanigera*." Scientia-Agricultura-Sinica **39**(10): 2023-2027.
- Zhu-Salzman, K., R. A. Salzman, J.-E. Ahn and H. Koiwa (2004). "Transcriptional Regulation of Sorghum Defense Determinants against a Phloem-Feeding Aphid." Plant Physiology **134**(1): 420-431.
- Zhu, Y., S. Lim, S. Schenck, A. Arcinas and E. Komor (2010). "RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR detection of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) in symptomatic and asymptomatic plants of Hawaiian sugarcane cultivars and the correlation of SCYLV titre to yield." European Journal of Plant Pathology **127**(2): 263-273.
- Zimmerman, E. C. (1948). Insects of Hawaii. Vol. 5. Homoptera: Sternorrhyncha. Honolulu, University of Hawaii Press, 464pp.
- Žurovcova, M., J. Havelka, P. Sary, P. Vechtova, D. Chundelova, A. Jarosova and L. Kucerova (2010). "“DNA barcoding” is of limited value for identifying adelgids (Hemiptera: Adelgidae) but supports traditional morphological taxonomy." European Journal of Entomology **107**: 147-156.

Abstract

The yellow leaf disease cause significant yield losses in sugarcane. It is caused by the *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV, Genus: *Polerovirus* Family: Luteoviridae), which is circulatively transmitted, mainly by the aphid *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Hemiptera: Aphididae). Varietal resistance being one of the most efficient control methods for viral diseases, the characterization of durable and efficient sources of resistance to the yellow leaf disease is a major concern for sugarcane breeding.

The aim of this thesis was to characterize varietal resistance to the yellow leaf disease, and was led onto three approaches: i/ identification of molecular markers associated to virus and aphid resistance in cultivar populations; ii/ fine characterization of mechanisms affecting aphid biology on resistant cultivar R 365; iii/ assessment of the genetic diversity of *Melanaphis* spp. populations on *Sorghum* spp. and sugarcane.

The identification of markers associated with yellow leaf disease resistance was carried out using an association mapping approach on two cultivar panels cropped in Reunion and Guadeloupe. Genotyping of the two panels was done using AFLP and DArT markers, and phenotyping was performed in natural infestation conditions. The marker trait association study allowed us to identify 45 haplotypes significantly associated with resistance to the virus or its vector. Five of these haplotypes were associated with virus resistance in both panels, and three haplotypes were associated with both vector infestation and virus incidence.

The characterization of resistance to *Melanaphis sacchari* on cultivar R 365 allowed us to demonstrate that this resistance is expressed as well as antixenosis and antibiosis. The studying of feeding behavior using the EPG technique showed that resistance affects the aphid in two ways: it delays the setting up of phloem salivation, and totally prevents the passive uptake of phloem sap during the first eight hours of the interaction. Moreover, the resistance of R 365 is also expressed towards another aphid vector of SCYLV, the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (Hemiptera: Aphididae).

The genetic diversity study was based on a worldwide collection of aphids sampled from *Sorghum* spp. and sugarcane. A morphometric study revealed distinct taxa corresponding to the species *Melanaphis sacchari* and *M. sorghi*. However, the sequencing of an excerpt of the COI locus did not allow us discriminating individuals between the two species accurately. We constructed a microsatellite library specific to *Melanaphis sacchari* and selected 10 polymorphic loci to conduct a diversity study, at two scales. At the worldwide scale, aphid populations appeared strictly asexual, strongly structured by geography and with a low diversity within geographic areas. At the Reunion Island scale, host structuring was found between sugarcane and wild sorghum, some genotypes being preferentially found on one of the two species.

Keywords: plant resistance, association mapping, Yellow leaf disease, Luteoviridae, taxonomy, genetic diversity.

Résumé

La maladie de la feuille jaune peut entraîner d'importantes pertes de rendement chez la canne à sucre. Elle est causée par le *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV, genre : *Polerovirus*, famille : Luteoviridae), qui est principalement transmis par le puceron *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Hemiptera : Aphididae). La résistance variétale étant le principal moyen de lutte contre les maladies virales, la caractérisation de sources de résistances efficaces et durables à la maladie de la feuille jaune est un enjeu majeur pour l'amélioration variétale de la canne à sucre.

Au cours de cette thèse, la caractérisation la résistance à la maladie de la feuille jaune a été entreprise sous trois angles : i/ l'identification de marqueurs moléculaires associés à la résistance au SCYLV et à *Melanaphis sacchari* au sein du germplasm cultivé ii/ la caractérisation fine des mécanismes de résistance à *M. sacchari* chez le cultivar R 365 et iii/ l'évaluation de la diversité génétique des populations de *Melanaphis* spp. présentes sur la canne à sucre et sur *Sorghum* spp.

L'identification de marqueurs associés à la résistance à la maladie de la feuille jaune a été réalisée par une approche d'association mapping menée sur deux panels de cultivars à la Réunion et en Guadeloupe. Ces deux panels ont été génotypés en utilisant les technologies AFLP et DArT. Leur phénotypage a été réalisé en conditions d'infestation naturelles. Ces travaux ont permis d'identifier 45 haplotypes significativement associés à la résistance à la maladie de la feuille jaune ou à son vecteur. Cinq des haplotypes associés à la réduction de l'incidence du virus ont été co-détectés dans les deux panels de cultivars. Trois haplotypes regroupent des marqueurs associés à la fois à l'incidence du vecteur et à celle du virus.

La caractérisation de la résistance à *Melanaphis sacchari* chez le cultivar R 365 nous a permis de mettre en évidence un effet d'antixénose et un effet d'antibiose. L'étude du comportement alimentaire du puceron par EPG a montré que la résistance agissait à deux niveaux : elle augmente le temps nécessaire à l'établissement dans le phloème, puis empêche l'ingestion passive de sève élaborée durant les huit premières heures. La résistance du cultivar R 365 affecte également *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (Hemiptera: Aphididae) un autre puceron vecteur du SCYLV.

L'étude de la diversité génétique a été basée sur une collecte mondiale de pucerons du genre *Melanaphis* collectés sur canne à sucre et *Sorghum* spp. Une étude morphométrique a mis en évidence plusieurs groupes de populations morphologiquement distincts, correspondant aux espèces *M. sacchari* et *M. sorghi*. Cependant, le séquençage du locus COI n'a pas permis de discriminer de façon claire les deux espèces. Nous avons développé une banque de microsatellites spécifiques de *Melanaphis sacchari*, qui a permis de mener l'étude de la diversité génétique des populations en utilisant 10 loci microsatellites polymorphes. La diversité a été étudiée à deux échelles. A une échelle mondiale les populations sont apparues strictement clonales, avec une faible diversité génétique intra zone géographique et une forte structuration par leur localisation géographique. A l'échelle de la Réunion, nous avons mis en évidence une structuration par l'hôte, certains génotypes se trouvant préférentiellement sur canne à sucre ou sur *Sorghum verticilliflorum*.

Mot clefs : Résistance variétale, Association Mapping, Yellow leaf disease, Luteoviridae, taxonomie, diversité génétique